Biochemische und genetische Untersuchungen zur DNA-Replikation des B. subtilis — Bakteriophagen SPP 1

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Biologie (23)
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
K l a u s B u r g e r
aus Stuttgart
Berlin 1978

Biochemische und genetische Untersuchungen zur DNA-Replikation des *B. subtilis* - Bakteriophagen SPP1

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

des

Fachbereichs Biologie (23)

der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

K l a u s B u r g e r

aus Stuttgart

Berlin 1978

1. Gutachter: Prof. Dr. T. A. Trautner

2. Gutachter: Prof. Dr. E.-R. Lochmann

Tag der mündlichen Prüfung: 2. März 1978

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin-Dahlem in der Zeit von Februar 1975 bis Februar 1978 angefertigt.

Herrn Professor Dr. T. A. Trautner danke ich für die großzügige Unterstützung und die intensive und sorgfältige Betreuung. Ferner möchte ich Herrn Dr. W. Messer, Herrn Dr. P. Galland, Herrn Dr. J. Reeve und anderen Mitgliedern der Abteilung für wertvolle Diskussionen und Hilfen danken.

Besonderen Dank möchte ich Frau Dr. G. Morelli für ihre Anleitung bei der Elektronenmikroskopie aussprechen.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis: Seite

1. Einleitung 1

2. Material und Methoden 4

2.1 Abkürzungen 4

2.2 Medien und Platten 5

2.3 Bakterienstämme 6

2.4 Konstruktion restringierender und supprimierender dnaB ts134 Stämme 7

2.4.1 Gewinnung transformierender DNA 7

2.4.2 Konstruktion von KB1 7

2.4.3 Konstruktion von KB3 8

2.5 Bakteriophagen 8

2.6 Phagen- und Phagen-DNA-Präparation 10

2.6.1 Präparation von ^{3}H-SPP1 Phagen und -DNA 10

2.6.2 Präparation von ^{3}H-T3 DNA 11

2.6.3 Präparation von Ø29 Phagen 11

2.7 Transfektion von kompetenten Zellen 12

2.8 Helfertransfektion 12

2.9 Puffer 13

2.10 Chemikalien, Enzyme, Sonstiges 14

2.11 Membranpräparation und Renografingradienten 15

2.12 Reisolierung membrangebundener DNA 15

2.13 Äthanolfällung 15

2.14 Sucrosegradientenzentrifugation 16

2.15 Anzucht von dnaB ts134 Stämmen und Replikationsmarkierung 16

2.16 Zellaufschluß zur Analyse replizierender DNA auf Sucrosegradienten 17

2.17 CsCl-Dichtegradienten 18

2.18 Quantitative Reisolierung replizierender SPP1 DNA 18

2.18.1 Abtrennung der Wirts-DNA über D_2O-Vormarkierung 18

2.18.2 Abtrennung der Wirts-DNA über Vormarkierung mit 5-BU 19

2.19 Eco RI-Verdauung reisolierter DNA und Agarose-Gelelektrophorese 20

2.20 Elektronenmikroskopie 20

3. Ergebnisse 21

3.1 DNA-Membranbindung: Nachweis und Eigenschaften des Komplexes bei Transfektion 21

3.1.1 Nachweis von Membranbindung bei homologer und heterologer Transfektion in B. subtilis 21

3.1.2 Kontrollen der Nachweistechnik 23

3.1.3 Charakterisierung des DNA-Membrankomplexes 24

3.1.4 Gibt es Inhibitoren der Komplexbildung bei Transfektion? 25

3.1.5 Charakterisierung der gebundenen DNA nach Transfektion 27

3.2 Membranbindung infizierender SPP1 DNA 29

3.2.1 Nachweis von Membranbindung bei Infektion mit SPP1 29

3.2.2 Erfordert die Komplexbildung bei Infektion Replikation, RNA- oder Proteinsynthese? 30

3.2.3 Charakterisierung der gebundenen DNA nach Infektion 30

3.3 Markierungssystem für replizierende SPP1 DNA 32

3.3.1 B. subtilis dnaB ts134 erlaubt selektive Phagenmarkierung 33

3.3.2 Kontrollen für das Markierungssystem 35

3.3.3 Biologische Tests mit dem Markierungssystem 37

3.3.4 Die Membran ist Syntheseort für replizierende SPP1 DNA 38

3.3.5 Charakterisierung der an der Membran synthetisierten DNA 41

3.4 Sucrosegradienten mit selektiv markierter DNA 43

3.4.1 Pulsmarkierte DNA in r^+/r^--Stämmen 43

3.4.2 Größe der neu-synthetisierten DNA in Zeitabhängigkeit 45

3.4.3 Ist schnell sedimentierende DNA eine konkatemere Form von SPP1 DNA? 47

3.4.4 Untersuchung der konkatemeren DNA 49

3.5 Dichteshiftexperimente zur quantitativen Reisolierung replizierender SPP1 DNA 51

3.5.1 Dichteshift der Wirts-DNA mit schwerem Wasser 51

3.5.2 Dichteshift der Wirts-DNA mit 5-Bromuracil 53

3.6 SPP1 Cistren für Phagenreplikation 55

3.6.1 SPP1 Replikation ist abhängig von Proteinsynthese 56

3.6.2 Suche nach temperatursensitiven SPP1-Mutanten, die in der DNA-Synthese geschädigt sind 57

3.6.3 Mutante tsI17 58

3.6.4 Renaturierungskinetik bei ts-Mutanten 61

3.6.5 Suche nach amber-Mutanten von SPP1, die in der DNA-Synthese geschädigt sind 63

3.6.6 Komplementationskinetik 64

4. Diskussion 66

4.1 Welche Rolle spielt die Zellmembran bei Transfektion und Infektion von SPP1? 66

4.2 Markierungssystem für replizierende SPP1 DNA - Sedimentationsanalyse replikativer Intermediate 70

4.3 Quantitative Reisolierung replizierender SPP1 DNA 71

4.4 SPP1 Cistren für Phagenreplikation 73

5. Zusammenfassung 78

6. Literatur 80

1. Einleitung

Der virulente Bakteriophage SPP1 von B. subtilis enthält ein lineares Doppelstrang-DNA-Molekül von einem Molekulargewicht von 27 x 10^6 Dal.

Da Infektion mit isolierter SPP1 DNA (= Transfektion, Földes und Trautner, 1964) Möglichkeiten zur in vitro Manipulation des Erbguts des Phagen gibt und da die komplementären Einzelstränge der DNA leicht mittels Poly-UG oder ribosomaler RNA in CsCl-Dichtegradienten auftrennbar sind (Riva, 1968), ist SPP1 ein genetisch gut untersuchter Phage, bei dessen relativ geringer Größe die Regulation der Genexpression aufgeklärt werden kann. Untersuchungen von Esche (1974) zeigen, daß SPP1 wie SPO2c (Kolenbrander et al., 1972), Ø29 (Schachtele et al., 1973) oder λ (Echols, 1971) zu einer Gruppe von Phagen gehört, die die makromolekularen Synthesen der Wirtszelle nicht wesentlich beeinflußt. Darüber hinaus scheint das Fortbestehen von Wirtsfunktionen für SPP1 essentiell zu sein: UV-Bestrahlung der Wirtszellen vor Infektion verhindert Phagenentwicklung.

Die Expression später SPP1 Gene ist von der DNA-Replikation abhängig: späte Genprodukte wurden nicht gefunden nach Infektion in Gegenwart von HPUra, einem Hemmstoff der auch von SPP1 benutzten DNA-Polymerase III von B. subtilis, oder nach Infektion unter nicht-permissiven Bedingungen mit einer in der DNA-Replikation geschädigten amber-Mutante. Da der Phage neben der DNA-Polymerase III auch die RNA-Polymerase des Wirts benutzt, ist es sehr schwer, das Auftreten

phagenspezifischer Funktionen vor dem Hintergrund der B. subtilis-Aktivitäten zu verfolgen.

Bei der Analyse der DNA-Replikation von SPP1 ergeben sich zusätzliche Schwierigkeiten: da der Phage die Wirtsreplikation nicht aktiv abzustellen scheint, und die Dichte von SPP1 DNA genau gleich wie die von B. subtilis DNA (1.703 g/cm^3) ist, kann man SPP1 DNA nicht direkt markieren und von Wirts-DNA unterscheiden. Bis zum Aufbau eines selektiven Markierungssystems für replizierende SPP1 DNA sollte daher in Fortführung der Arbeiten von R. Kahmann (1974) das Schicksal parentaler transfizierender und infizierender DNA untersucht werden. Da in allen bisher daraufhin geprüften Systemen parentale und oft auch replizierende Phagen-DNA in Assoziation mit der Zellmembran des Wirtsbakteriums gefunden wurde, konnte im SPP1 System - sollte auch hier eine Membranbindung festgestellt werden - transfizierende und infizierende DNA, deren Aufnahmemechanismen total verschieden sind, bezüglich ihres Bindungsverhaltens verglichen werden.

Die weiteren Fragestellungen dieser Arbeit waren nach Schaffung eines selektiven Markierungssystems für replizierende SPP1 DNA zu beantworten:

1. Wo in der Zelle werden SPP1 DNA-Moleküle synthetisiert?
2. Was sind die Eigenschaften solcher replizierenden Moleküle? - Erklären sie die Entstehung partieller zirkularer Permutation der SPP1 Genkarte?
   (Trautner et al., zur Veröffentlichung)

3. Können diese Moleküle quantitativ isoliert werden?
4. Welche und wieviele Phagengene sind für die SPP1 DNA-Replikation verantwortlich?

2. Material und Methoden

2.1 Abkürzungen

AdR	2'-Desoxyadenosin
5-BU	5-Bromuracil
5-RUdR	5-Bromo-2'desoxyuridin
B. subtilis	Bacillus subtilis
cfu	Kolonie-bildende Einheiten
cpm	Zählimpulse pro Minute
CsCl	Caesiumchlorid
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Äthylendiaminotetraessigsäure
HPUra	6p-(Hydroxyphenylazo-)uracil
Nal	Nalidixinsäure
pfu	Plaque-bildende Einheiten
PPO	2,5-Diphenyloxazol
POPOP	1,4-bis-2-(5 Phenyloxazolyl)-Benzol
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TdR	2'-Desoxythymidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ts	temperatursensitiv
UR	Uridin
WT	Wildtyp

2.2 Medien und Platten

a) Trypton-Yeast Medium (TY) (Rottländer und Trautner, 1970)

b) Wachstumsmedium für kompetente Zellen (Rottländer und Trautner, 1970)

c) Nutrient broth Medium (NB) (Spatz und Trautner, 1971)

d) HIII Medium zur Anzucht von markierten SPP1 Phagen: 0,2 % $(NH_4)_2SO_4$, 1,4 % K_2HPO_4, 0,6 % KH_2PO_4, 0,1 % Na-Citrat x 2 H_2O, 0,15 % Asparagin, 0,6 % DL-Tryptophan, 15 mM $MgSO_4$, 1,5 mM $MnSO_4$, 0,35 % Vitaminlösung nach Kahmann (1974), $1,5 \cdot 10^{-6}$ M $FeCl_3$, 0,037 % Casamino acids, 0,7 % Glucose

e) DNA-Verdünnungsmedium (Rottländer und Trautner, 1970)

f) MIIIM-Medium (Esche, 1974)

g) MIIIS-Medium (Esche, 1974)

h) M9-Medium zur Anzucht von markierten T3 Phagen: 0,74 % $Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$, 0,3 % KH_2PO_4, 0,1 % NH_4Cl, 0,05 % NaCl, 0,5 % Glucose, 10^{-4} M $MgSO_4$

i) LTT-Platten zur Phagentitration (Spatz und Trautner, 1970)

j) Minimalplatten MIII (Spizizen, 1958)

2.3 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind mit Genotyp und Herkunft bzw. Referenz in Tab. 1 aufgeführt.

Tabelle 1

Stamm-Bezeichnung	Genotyp	Referenz
MCB	trp^-	Spatz und Trautner (1971)
222	trp^- arg^-	Hirokawa
168-2	trp^-	Trautner
168-3	trp^- thy^-	Kahmann (1974)
PB566/2	thy^- arg^-	Polsinelli
HA101B	met^- $[leu^-$ $his^-]^+$ su^+	Okubo und Yanagida (1968)
su^{3+}	leuA8 $[thr5$ $metB5]^+$ su^+	Georgopoulos
R	prototroph r^+m^+	Trautner et al.(1974)
dnaB ts134	dnaB ts134 trpC2, thyA, thyB	Mendelson (1967)
KB1	dnaB ts134 trpC2, thyA thyB r^+m^+	diese Arbeit
KB3	dnaB ts134 thyA thyB su^{3+}	diese Arbeit
QB955	ara62 leuA8 metB5, sacA321	Dedonder
E.coli B_{S-1}	thy^-	Schweiger

2.4 Konstruktion restringierender und supprimierender dnaB ts134 Stämme

2.4.1 Gewinnung transformierender DNA

50 ml su^{3+} bzw. R-Zellen aus der logarithmischen Phase wurden einmal mit 0,1 M Na-Acetat + 10 mM EDTA, pH 7, gewaschen, in 2 ml desselben Puffers aufgenommen, 10 min bei 37° mit final 500 µg Lysozym/ml lysiert und danach mit final 500 µg vorverdauter Pronase P/ml 60 min bei 55° inkubiert. Die Lyse wurde mit final 0,25 % SDS (5 min 60°) vervollständigt. Die klare Lösung wurde einmal phenolisiert, der Überstand mit Äthanol gefällt und das Präzipitat in SSC + 2 mM EDTA aufgenommen.

2.4.2 Konstruktion von KB1

Zu 4,5 ml kompetenten Zellen von dnaB ts134 wurde 0,5 ml R-DNA der Konzentration 50 µg/ml gegeben. Nach 60 min Transformation bei 30° wurde der Ansatz mit 5 ml TY-Medium verdünnt und die Inkubation 2 Std. bei 30° fortgesetzt. Gegen nicht-restringierende Zellen wurde mit SPP1·0 Phagen (input-Multiplizität von 2) selektioniert. Verdünnungen des Lysats wurden nach 30 min auf TY-Platten ausgestrichen und die Überlebenden auf Platten mit jeweils 10^8 SPP1·0 bzw. 10^8 SPP1·R-Phagen gestempelt. Adsorptionsresistente Zellen wurden weder von SPP1·0 noch von SPP1·R lysiert; einige Kolonien dagegen lysierten bei Infektion mit SPP1·R, nicht aber mit SPP1·0, waren also restringierend. Die Kolonie mit dem besten Restriktionsverhältnis (KB1) wurde auf Tem-

peratursensitivität geprüft. Außerdem wurde durch Cotransduktionskartierung mit PBS1 im Vergleich zum benachbarten Marker ara62 die Integrität des dnaB Markers bestätigt.

2.4.3 Konstruktion von KB3

4,5 ml kompetente Zellen von dnaB ts134 wurden mit 0,5 ml su^{3+} DNA der Konzentration 50 µg/ml 60 min bei 30° transformiert, die Zellen mit TBT gewaschen und auf Minimalplatten mit Thymin ohne Tryptophan ausgestrichen. Tryptophan-positive Transformanten wurden auf TY-Platten mit 10^8 am109 Phagen/Platte gestempelt. Eine Transformante (KB3), die von am109 lysiert werden konnte, war noch temperatursensitiv und ermöglichte Wachstum von amber-Phagen.

2.5 Bakteriophagen

Tabelle 2 enthält die in der Arbeit verwendeten Bakteriophagen.

Tabelle 2

Bezeichnung	Herkunft
T3	Schweiger
Ø29	Trautner
PBS1	Dedonder
SPP1 WT	Riva et al. (1968)
SPP1·R	auf modifiz. Stämmen R oder KB1 gewachsener SPP1

Bezeichnung	Referenz
SPP1 Mutanten:	
a) temperatursensitive:	
A12, A14, A38, A40 A58, A66 A74, A80	Ganesan
B3, bM, M10	Montenegro et al. (1976)
I1, I5, I10, I13, I14, I15, I17, I20, I20F, I71	Polsinelli
G6, G7, G19, 3M, 6M, 8M, M5 M28	Trautner
b) amber-Mutanten:	
am2, am12, am22, am31, am46 am62, am70, am82, am86, am87 am92, am99, am106, am109, am118	Esche (1974)
am128	Behncke (1973)
am7, am1x9	Trautner

Jede SPP1 Mutante repräsentiert ein eigenes Cistron mit Ausnahme der folgenden, die innerhalb der aufgeführten Gruppen nicht komplementieren:

I : A38, A66, am99

II : A74, A80, I13, am12, am109

III: I1, 6M, am62

IV : I71, am86

V : M5, am82

VI : am2, am87, am106, am114

2.6 Phagen- und Phagen-DNA-Präparation

SPP1 WT-Phagenpräparation und Plattenlysate für ts-Mutanten sind bei Montenegro et al. (1976) beschrieben. Amber-Mutanten wurden nach der Vorschrift von Esche (1974) gezogen. Nur Mutanten mit einer Reversionsrate kleiner als 10^{-5} wurden verwendet.

Differentielle Phagenreinigung und DNA-Gewinnung (auch mit radioaktiv markierten Phagen) folgten der Vorschrift von R. Kahmann (1974), ebenso die Präparation von ^{14}C-SPP1.

2.6.1 Präparation von ^{3}H-SPP1 Phagen und -DNA

Eine Übernachtkultur von MCB in HIII-Medium wurde 1:10 mit frischem Medium verdünnt und bis zu einer Zellkonzentration von $5 \cdot 10^{8}$ Bakterien/ml bei 37° geschüttelt. Die Zellen wurden dann unter gleichzeitiger Zugabe von 15 µCi [6-^{3}H]UR/ml mit einer input-Multiplizität von 2 Phagen/Bakterium infiziert. 40 min nach Infektion wurden nochmals 15 µCi [6-^{3}H]UR/ml zugesetzt und die Zellen bis zur Lyse weitergeschüttelt. Nach Barlatti (1970) wird UR in B. subtilis und SPP1 effizient in dCTP umgewandelt, so daß auch DNA hoch markiert werden kann.

Zur Entfernung zellulärer RNA und DNA wurden die konzentrierten Phagen vor der Reinigung in CsCl-Dichtegradienten 45 min bei 37° mit 100 µg RNaseA/ml, 100 Einheiten RNase T_1/ml und 2 µg DNaseI/ml inkubiert.

Die aus diesen Phagen isolierte DNA erreichte spezifische

Aktivitäten von 1-2 x 10^5 cpm/µg DNA, vergleichbar mit ^{32}P-DNA.

2.6.2 Präparation von ^{3}H-T3 DNA

B_{S-1} thy^--Zellen wurden in M9 Medium, supplementiert mit 3 µg Thymin/ml, bei 37° bis zu einer Zellkonzentration von 4 x 10^8 Bakterien/ml gezogen. Dann wurde die Thyminkonzentration durch Verdünnen mit M9 Medium auf 2 µg/ml gesenkt, 6,25 µCi ^{3}H-TdR/ml zugesetzt, und die Inkubation 30 min fortgesetzt bis zur Infektion mit T3 Phagen in einer input-Multiplizität von 0,1 Phagen/Zelle. Nach Infektion wurden nochmals 6,25 µCi ^{3}H-TdR/ml zugegeben und die Zellen bis zur vollständigen Lyse weitergeschüttelt.

Die gereinigten Phagen wurden mit 90 %igem Phenol, enthaltend 10 % Tris-Base und 0,1 % 8-Hydroxychinolin, phenolisiert. Die daraus isolierte DNA hatte eine spezifische Aktivität von 2 x 10^4 cpm/µg DNA.

2.6.3 Präparation von Ø29 Phagen

168-2-Zellen, die bis zu einer Zelldichte von $3 \cdot 10^8$ Bakterien/ml, in TY supplementiert mit 1 mM $CaCl_2$, gewachsen waren, wurden in Gegenwart von 100 µg HPUra/ml mit Ø29 der input-Multiplizität von 5 Phagen/Zelle infiziert und bis zur Lyse weiterinkubiert. Die Phagenreinigung erfolgte wie bei SPP1.

2.7 Transfektion von kompetenten Zellen

Die Transfektion von jeweils 10 ml kompetenten Zellen des Stammes 222 wurde wie bei Kahmann (1974) geschildert ausgeführt, mit der Modifizierung, daß die Zellkonzentration mit DNA-Verdünnungsmedium auf 1 x 10^7 Zellen/ml halbiert und die DNA-Konzentration wegen der hohen spezifischen Aktivität der eingesetzten DNA auf 2 µg/ml gesenkt wurde. Weiterhin erfolgte die DNaseI-Behandlung am Ende der jeweils angegebenen Inkubationszeit mit einer Endkonzentration an Enzym von 10 µg/ml.

2.8 Helfertransfektion

Inkubiert man kompetente Zellen 5 min bei 30° mit 0,1 M $MgCl_2$, so erhöht sich die Sensitivität des nachfolgenden Helfertests beträchtlich. Die so vorbehandelten Zellen wurden 10 min bei 37° mit Helferphagen (am99) der input-Multiplizität von 5 infiziert. Danach wurden die infizierten Zellen mit gleichen Volumina der zu testenden Fraktionen des Sucrosegradienten transfiziert (30 min 37°) und nach 5 min DNaseI-Behandlung mit MCB-Zellen in geeigneten Verdünnungen auf LTT-Platten ausgestrichen.

2.9 Puffer

a) Puffer 1xNCP/EDTA: 0,01 M Na-Citrat, 0,08 M K_2HPO_4, 0,04 M KH_2PO_4, 0,01 M EDTA, pH 7,4

b) Puffer 2xNCP/EDTA: 0,2 M NaCl, 0,02 M Na-Citrat, 0,16 M K_2HPO_4, 0,08 M KH_2PO_4, 0,01 M EDTA, pH 7,4

c) Phagenpuffer TBT: 0,1 M Tris, 0,1 M NaCl, 0,01 M $MgCl_2$, pH 7,5

d) Lysepuffer: 0,05 M Tris, 0,005 M EDTA, pH 7,5

e) Sucrosepuffer,
neutral: 0,01 M EDTA, 0,5 M NaCl, pH 7,5
alkalisch: mit NaOH auf pH 12 eingestellt

f) Eco RI-Puffer: 0,1 M Tris, 0,03 M $MgCl_2$, pH 7,5

g) Elektrophorese-puffer: 0,04 M Tris, 0,005 M Na-Acetat, 0,001 M EDTA, pH 7,9

h) L-Puffer: (Spreitungspuffer) 68 % Formamid, 0,125 M Tris, 0,01 M EDTA, pH 8,4

2.10 Chemikalien, Enzyme, Sonstiges

Agarose	Bio-Rad
Antiserum	Kaninchenserum ($K = 400\ min^{-1}$)
5-BU	Serva
Caesiumchlorid (Suprapur)	Merck
Chloramphenicol	Sigma
DNaseI	Boehringer
Eco RI	Boehringer
EDTA	Merck
Glasfiberfilter (Nr. 8)	Schleicher und Schüll
HPUra	Neil Brown
8-Hydroxychinolin	Merck
Instagel	Packard
Lysozym	Serva
N-Laurylsarkosin	Merck
Nalidixinsäure	Sigma
PPO	Packard
POPOP	Packard
Pronase P	Serva
Proteinase K	Merck
Radiochemikalien	Radiochemical Centre Amersham
Renografin (Uromiro 380)	Squibb
Rifampicin	Calbiochem
RNaseA	Worthington
RNase T_1	Serva
SDS	Merck
Sucrose	Schwarz/Mann
Tris	Merck

2.11 Membranpräparation und Renografingradienten

Die von Ivarie und Pène (1970) entwickelte Methode wurde beibehalten. Die NCP-Puffer enthielten zusätzlich 10 mM EDTA. Die 0-38 %igen Gradienten (12,5 ml) wurden 3,5 Std. in einem SW41 Rotor bei 32000 rpm, 2° , zentrifugiert und vom Boden her in etwa 37 Fraktionen zu 20 Tropfen ausgetropft.

2.12 Reisolierung membrangebundener DNA

Die aus Renografingradienten gewonnene Membranfraktion (etwa 0,3 ml) wurde mit 0,1 ml 100 mM EDTA versetzt und mit final 4 mg/ml vorverdauter Pronase P 10 min bei 37° verdaut. Nach Zusatz von final 2 % N-Laurylsarkosin und mindestens 20 minütiger Inkubation bei 55° wurde die von der Membran befreite DNA gegen SSC + 2 mM EDTA dialysiert, mit Äthanol gefällt und in 200 µl SSC + 2 mM EDTA resuspendiert. Sie konnte jetzt auf 5-20 %ige Sucrosegradienten analysiert werden.

2.13 Äthanolfällung

DNA in SSC + 2 mM EDTA wurde mit 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat, pH 5,4, versetzt und mit 2 Vol. abs. Äthanol (-20°) gefällt. Nach mindestens 6 h bei -20° wurde das Präzipitat im SS34 Rotor 30 min bei 12000 rpm, -10° , zentrifugiert.

2.14 Sucrosegradientenzentrifugation

Die Sucroselösungen enthielten 0,01 M EDTA und 0,5 M NaCl, pH 7,5 bzw. pH 12. Es wurden 5-20 %ige lineare Gradienten (12 ml) über einem Kissen von 0,5 ml 60 %iger Sucrose gemischt. Zentrifugiert wurde 2,5 h in einem SW41 Rotor bei 36000 rpm, 20° . Wo erforderlich, wurden Sedimentationsstandards (meist ^{14}C-SPP1 DNA) im gleichen Röhrchen mitzentrifugiert. Die Röhrchen wurden von unten ausgetropft in etwa 35 Fraktionen zu 20 Tropfen. Die Größenbestimmung konkatemerer DNA erfolgte nach der Formel von Burgi und Hershey (1963):

$$\frac{S^{o}_{20,W_1}}{S^{o}_{20,W_2}} = \left[\frac{M_1}{M_2}\right]^{0,35}$$

2.15 Anzucht von dnaB ts134 Stämmen und Replikationsmarkierung

Eine Übernachtkultur von dnaB ts134 in TY-Medium + 50 µg Thymin/ml wurde im selben Medium, supplementiert mit 200 µg AdR/ml zu einer Zellkonzentration von 4 x 10^7 Zellen/ml verdünnt. (AdR gewährleistet Linearität des Thymineinbaus (Boyce und Setlow, 1962)). Diese Kultur wurde dann bis zu einer Zelldichte von 2,5 x 10^8 Zellen/ml bei 30° gezogen, vierfach in TY + 5 µg Thymin/ml + 200 µg AdR/ml konzentriert und 25 min bei 45° geschüttelt. Ab jetzt wurde die Temperatur auf 45° gehalten. 50 µg NaI/ml wurde zugesetzt und für weitere 15 min inkubiert. Danach wurde mit WT oder

Mutantenphagen infiziert, mit den Multiplizitäten, die im jeweiligen Experiment angegeben sind. Nach 6 min Adsorption wurde mit 3 Vol. vorgewärmtem TY-Medium verdünnt, das zusätzlich enthielt (Endkonzentrationen im verdünnten Ansatz): SPP1 Antiserum in einer Verdünnung 1:200, 5 µg Thymin/ml, 200 µg AdR/ml, 50 µg NaI/ml und ^{3}H-TdR in einer spezifischen Aktivität von 6,6 µCi/ml. Für die Einbaukinetiken wurden 100 µl Proben entnommen und auf Glasfilter gegeben. Diese wurden einmal mit 10 % TCA, zweimal mit 5 % TCA und zweimal mit 96 % Äthanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurden sie in Plastikszintillationsgläschen überführt und nach Zugabe von PPO/POPOP/Toluol bzw. Instagel in einem Beckman LS230 oder einem Searle Mark III Szintillationszähler gemessen.

Einbaustudien mit anderen dnaB ts134-Stämmen wurden genauso ausgeführt.

2.16 Zellaufschluß zur Analyse replizierender DNA auf Sucrosegradienten

2 ml Proben infizierter Zellen, die, wie in 2.15 beschrieben, vorbehandelt waren und die Radioaktivität entsprechend den Versuchsangaben erhalten hatten, wurden einmal mit 10 ml eiskaltem Lysispuffer gewaschen, in 1 ml dieses Puffers resuspendiert und durch 10-minütige Inkubation mit final 0,5 mg Lysozym/ml bei 37° mit nachfolgender Zugabe von final 0,5 % SDS (5 min 60°) lysiert. Dieses Lysat wurde mit final 1 mg Proteinase K/ml 60 min bei 37° be-

handelt. 50-100 µl eines derartigen Lysats wurden auf Sucrosegradienten analysiert.

2.17 CsCl-Dichtegradienten

Mit dem aufzutrennenden DNA-Material wurde eine 56,4 %ige CsCl-Lösung (entspricht einer Anfangsdichte von 1,703 g/cm^3) hergestellt. Diese Lösung wurde 60 Std. bei 37000 rpm, 15° , in einem 50Ti Rotor zentrifugiert. Der dabei entstandene Dichtegradient wurde von unten in Fraktionen zu 12 Tropfen fraktioniert und aliquots auf Radioaktivität gemessen.

2.18 Quantitative Reisolierung replizierender SPP1 DNA

2.18.1 Abtrennung der Wirts-DNA über D_2O-Vormarkierung

5 ml dnaB ts134 Zellen, über Nacht bei 30° in MIIIM-Medium + 50 µg Thymin/ml, das mit 85 % D_2O zubereitet worden war (MIIIM-D_2O), gewachsen, wurden abzentrifugiert und in 10 ml desselben Mediums, das mit 2,5 µCi ^{14}C-Thymin (≙ 5,2 µg/ml) supplementiert war, bis zu einer Zelldichte von 2,5 x 10^8 Zellen/ml gezogen, einmal mit warmem MIIIM-D_2O gewaschen und in vierfacher Zellkonzentration in MIIIM-D_2O + 0,8 µCi ^{14}C-Thymin/ml + 4 µg kaltes Thymin/ml aufgenommen und 25 min bei 45° geschüttelt. Nach Zugabe von 50 µg NaI/ml und weiteren 15 min Inkubation wurden die Zellen mit MIIIM-H_2O (45°) gewaschen, in 2,5 ml MIIIM-H_2O + 50 µg NaI/ml + 5 µg Thymin/ml aufgenommen und mit einer input-Multiplizität von 4 SPP1 Phagen/Bakterium infiziert. Nach 5 min

Adsorption wurde der Ansatz mit demselben Medium + Antiserum in einer Endverdünnung von 1:400 vierfach verdünnt und nach 10 min Schütteln bei 45° 5 min mit 50 µCi ^{3}H-TdR/ml (45 Ci/mMol) markiert. Danach wurde die Radioaktivität mit 100 µg unmarkiertem Thymin/ml verdünnt, die Zellen wie in 2.16 gewaschen und lysiert und die DNA in einem CsCl-Gradienten (2.17) aufgetrennt.

2.18.2 Abtrennung der Wirts-DNA über Vormarkierung mit 5-BU

Eine exponentiell wachsende Kultur von dnaB ts134 in TY + 50 µg Thymin/ml wurde bei einer Zelldichte von 4 x 10^{8} Bakterien/ml abzentrifugiert, 1:10 verdünnt in 10 ml Ty + 20 µg 5-BU/ml aufgenommen und bis zu einer Zellkonzentration von 5 x 10^{8} Zellen/ml wachsen gelassen. Nach Verdünnung der 5-BU-Konzentration mit demselben Volumen TY auf 10 µg 5-BU/ml wurden 1,25 µCi [^{14}C]-5-BUdR/ml zugesetzt, 10 min bei 30° weiterinkubiert und dann für 40 min bei 45° geschüttelt. Die Zellen wurden durch Filtration mit warmem TY gewaschen und in 5 ml TY + 5 µg Thymin/ml aufgenommen. Nach 10 min Inkubation bei 45° zur Verdünnung des intrazellulären 5-BU-pools wurde mit einer input-Multiplizität von 10 SPP1 Phagen/Zelle infiziert, die 5-minütige Adsorption durch 1 min Inkubation mit Antiserum der Endverdünnung von 1:200 gestoppt, 15 ml vorgewärmtes TY-Medium + 5 µg Thymin/ml zugegeben und der Ansatz in 2 x 10 ml aufgeteilt. Die Ansätze erhielten nach weiteren 13 bzw. 22 min einen 20 sec-Puls mit 10 µCi ^{3}H-TdR/ml (45 Ci/mMol), der durch Zugabe von final 20 mM NaCN, 100 µg HPUra/ml, 200 µg

TdR/ml und 50 µg Thymin/ml bei 0° gestoppt wurde. Waschen und Lyse der Zellen und anschließende Dichtegradientenzentrifugation erfolgte wie in 2.16/2.17 mit der Modifikation, daß die gewaschenen Zellen zusätzlich 25 mM NaCN vor der Lyse erhielten.

2.19 Eco RI-Verdauung reisolierter DNA und Agarose-Gelelektrophorese

12,5 µl von CsCl über eine kleine Hydroxyapatitsäule befreite DNA in 400 mM Phosphatpuffer wurde mit 37,5 µl H_2O bidest. verdünnt und mit 30 mM $MgCl_2$ versetzt. Die Verdauung erfolgte durch zweimalige Inkubation mit je 2 Einheiten Eco RI für jeweils 30 min bei 37° . Das Enzym wurde 5 min bei 68° inaktiviert, die Probe mit 5 µl 50 %iger Sucrose + 0,2 % Bromphenolblau versetzt und als ganzes aufgetragen. Das 1 %ige Agarose-Slab-Gel wurde 16 h bei 10 mA gefahren.

2.20 Elektronenmikroskopie

10 µl der zu untersuchenden DNA aus den präparativen CsCl-Dichtegradienten wurden mit 200 µl L-Puffer verdünnt, 3 µl Col E1 DNA (18 µg/ml) als Größenstandard, 20 µl 0,1 %iges Cytochrom C und 3 µl 35 %iger Formaldehyd zugegeben. Die Spreitung erfolgte auf H_2O bidest. nach Kleinschmidt und Zahn (1959). Nach Rotationsbedampfung der Präparate mit Platin/Palladium wurde die DNA-Präparation bei einer Vergrößerung von 10000-fach in einem Siemens Elmiskop Ia ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1 DNA-Membranbindung: Nachweis und Eigenschaften des Komplexes bei Transfektion

In vielen untersuchten bakteriellen Systemen kommt der Cytoplasmamembran eine besondere Rolle in der Replikation zu. Hinweise dafür findet man z.B. in den elektronenmikroskopisch erfaßten Mesosomen-Invaginationsstellen der Membran, an die das B. subtilis-Chromosom herantritt (Ryter, 1968).

In verschiedenen Phasen des Lebenszyklus von Bakteriophagen findet man deren DNA in einer Membranfraktion der Wirtszelle wieder. Da für Transfektion bei B. subtilis, speziell für SPP1 DNA, Untersuchungen von Kahmann (1974) die Molekülgrößen und Struktur der Phagen-DNA nach ihrer Aufnahme in die Zelle weitgehend aufgeklärt haben, sollte herausgefunden werden, ob eine Membranbindung auch bei transfizierender DNA vorliegt und die Verhältnisse bei Infektion ähnlich sind.

3.1.1 Nachweis von Membranbindung bei homologer und heterologer Transfektion in B. subtilis

Zum Nachweis membrangebundener DNA kann man sich verschiedener Zentrifugationstechniken bedienen. Von Ivarie und Pêne (1970) wurden speziell für B. subtilis eine Methode zur Isolierung von Membran-DNA-Komplexen entwickelt, wobei die DNA nach Lysozymlyse der Zellen über einen vorgeformten Renografingradienten in schnell sedimentierende (membrangebundene) und freie DNA aufgetrennt wird. Schnell sedimentierende DNA wandert im Gradienten bis zur Gleichgewichtsdichte von Membranen. Abb. 1 zeigt das

Profil eines solchen Renografingradienten, bei dem ^{3}H-SPP1 DNA aus transfizierten B. subtilis-Zellen fraktioniert wurde: es gibt schnell sedimentierendes Material an Membranposition und sehr viel degradierte DNA geringer Größe (<$8 \cdot 10^{6}$ Dal), was nach R. Kahmanns Daten zu erwarten war. Die Beteiligung von Membranmaterial an der schnell sedimentierenden Komponente wird nachzuweisen sein. Bietet man kompetenten Zellen von B. subtilis

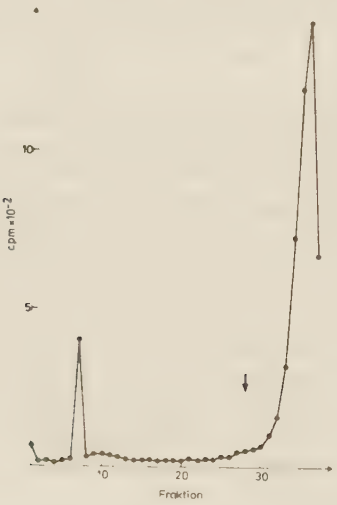


Abbildung 1: Renografin-Gradientenzentrifugation von ^{3}H-SPP1 DNA, reisoliert nach 15 min Transfektion. Die Sedimentationsrichtung ist in diesem wie auch in allen folgenden Gradienten von rechts nach links. Intakte SPP1 DNA bandet unter diesen Zentrifugationsbedingungen etwa in den Fraktionen 28-30 (wo ermittelt, als Pfeil angegeben).

DNA des Phagen T3 von E. coli, also heterologe DNA, an, die ebenfalls aufgenommen wird (R. Kahmann), so erhält man nach 15-minütiger DNA-Aufnahme dasselbe Bild wie bei SPP1 DNA: sie geht ebenfalls eine Bindung mit der Membran ein, während andererseits viel DNA nicht gebunden und degradiert vorliegt. T3

DNA ist biologisch nicht aktiv in B. subtilis, andererseits bindet sie an die Membran.

3.1.2 Kontrollen der Nachweistechnik

Wie spezifisch ist diese Bindung? Welche Artefakte sind denkbar?

1. Bindet DNA von außen an die Zelle und bleibt auch dort nach Lysozymbehandlung?
   Dies kann durch extensive Behandlung der Zellen mit DNaseI von der Lyse ausgeschlossen werden.

2. Besteht die Möglichkeit, daß markierte DNA im Lysat eingeschlossen und mit der Membranfraktion mitgerissen wird?
   Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurde zu einem Lysozymlysat aus nicht-transfizierten Zellen eine große Menge ^{3}H-SPP1 DNA gegeben und diese Mischung im Renografingradienten zentrifugiert. Der Gradient zeigte DNA ausschließlich an der Position nativer SPP1 DNA und etwas kleineren Materials, jedoch keinerlei Radioaktivität in Membranposition. Es handelt sich bei der DNA-Membranassoziation also nicht um einen Zentrifugationsartefakt, sondern um eine spezifische Bindung, die in Beziehung zum Transfektionsvorgang stehen muß.

3. Hängt diese Bindung vom Grad der Kompetenz der Zellen, d.h. von ihrer Aufnahmebereitschaft für exogene DNA, ab?
   Transfiziert man nicht-kompetente Zellen mit derselben Menge an ^{3}H-SPP1 DNA wie in vorigen Versuchen, so findet man kein Tritium an Membranposition und nur etwas abgebaute DNA im obersten Teil des Gradienten. Schnell sedimentierendes Material bildet sich demnach in Abhängigkeit zur Kompetenz der Zellen.

3.1.3 Charakterisierung des DNA-Membrankomplexes

Komplexe aus DNA und Membranen sollten sensitiv sein gegenüber Enzymen und Agenzien, die die Integrität der Komponenten zer-

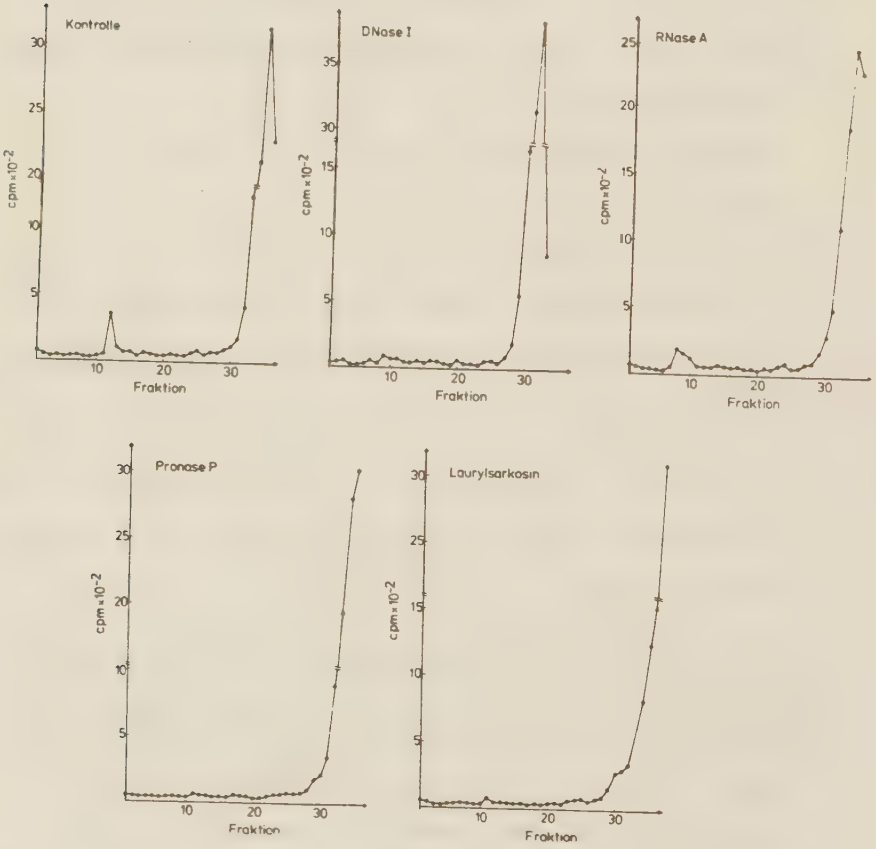
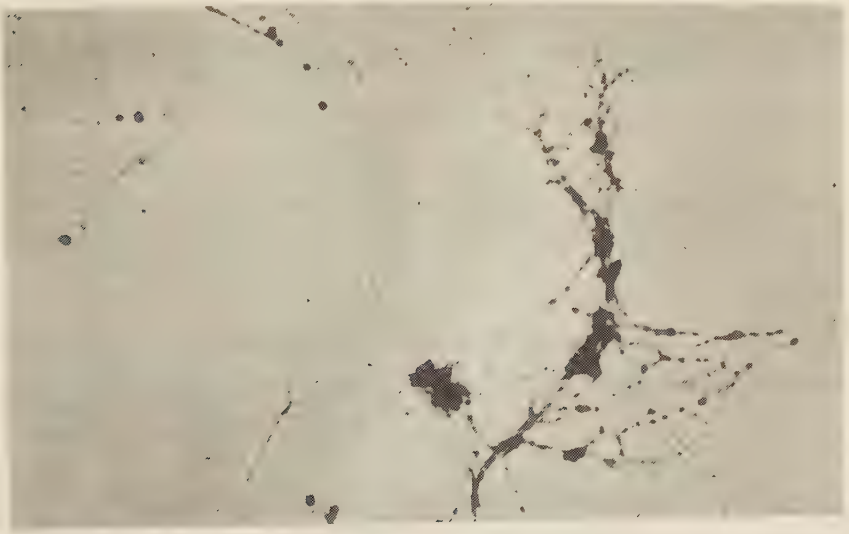


Abbildung 2: Sensitivitäten von DNA-Membrankomplexen. Analyse behandelter und unbehandelter Lysate von mit ^{3}H-SPP1 DNA transfizierten Zellen auf Renografingradienten. Behandlung der Lysate mit 50 µg/ml DNaseI (17 mM $MgSO_4$), 80 µg/ml RNaseA, 6 mg/ml PronaseP oder 1 % Laurylsarkosin für jeweils 5 min vor der Zentrifugation bei 37°. Kontrolle ist unbehandelt.

stören. Aus Abb. 2 wird ersichtlich, daß DNaseI-, PronaseP- oder Sarkosylbehandlung von Lysaten aus mit ^{3}H-SPP1 DNA transfizierten Zellen vor der Renografin-Zentrifugation die DNA-Membrankomplexe auflöst, während RNaseA-behandelte Lysate schnell sedimentierende DNA wie unbehandelte Lysate enthalten. Versuche in Zusammenarbeit mit Ph. Kohler (Univ. New Hampshire) demonstrieren außerdem die Phospholipase C-Sensitivität der Komplexe. Abb. 3 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme von Material



Abbidlung 3: DNA-Membrankomplex aus transfizierten Zellen. Vergrößerung etwa 25 000-fach.

aus einem DNA-Membrankomplex. Deutlich sieht man die DNA-Fäden, die von Membranfetzen ausgehen.

3.1.4 Gibt es Inhibitoren der Komplexbildung bei Transfektion?

Ist die Anheftung der DNA an die Membran möglicherweise Teil des Replikationsgeschehens? Dazu sollte versucht werden, ob sich die Komplexbildung mit HPUra, einem spezifischen Inhibitor

der von SPP1 benötigten B. subtilis Polymerase III (Mackenzie et al., 1973) verhindern läßt. Desgleichen war mit den Inhi-

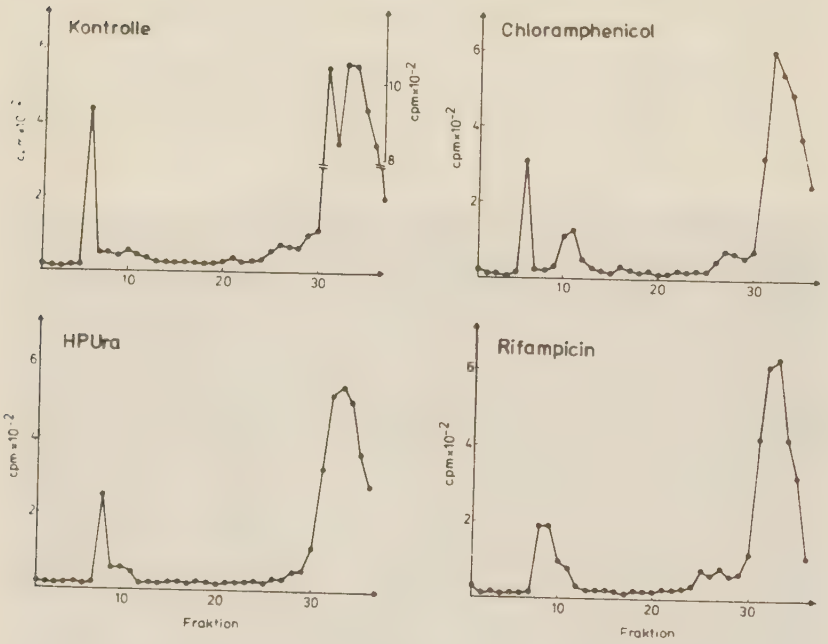


Abbildung 4: Renografinfraktionierung von DNA aus Zellen, die 10 min vor und während der 25-minütigen Transfektion mit ^{3}H-SPP1 DNA mit 150 µg/ml HPUra, 100 µg/ml Rifampicin oder mit 150 µg/ml Chloramphenicol behandelt worden waren. Als Vergleich dazu die unbehandelte Kontrolle.
Der Doppelpeak in der Membranfraktion des Gradienten aus Zellen, die mit Chloramphenicol vorbehandelt waren, ist ein Austropfartefakt.

bitoren Rifampicin und Chloramphenicol die Möglichkeit zu prüfen, ob RNA- oder Proteinsynthese zur DNA-Anheftung nötig sind. Abb. 4 zeigt, daß alle drei Inhibitoren, 10 min vor der transfizierenden DNA gegeben, keinen signifikanten Einfluß auf die Bildung schnell sedimentierenden Materials in Renografin-gradienten nach Transfektion haben. Dies spricht für eine Bindung an bereits vor Transfektion vorhandene Strukturen mit geringem turnover.

3.1.5 Charakterisierung der gebundenen DNA nach Transfektion

Renografingradienten geben keinen Aufschluß über die Größe der an die Membran gebundenen DNA. Es ist also offen, ob es sich hierbei um Oligonukleotide, um SPP1-Monomere oder etwa um Multimere, also Replikationsformen, handelt. Bei den bisher gezeigten Renografingradienten wurde im Bereich nicht-gebundener, frei sedimentierender DNA nie monomere oder größere DNA gefunden, sondern immer nur Abbauprodukte. Welche Größenklassen sind mit der Membran komplexiert?

Im folgenden Versuch wurden kompetente Zellen von B. subtilis 222 mit ^{3}H-SPP1 DNA 10 min bzw. 27,5 min transfiziert, die Zellen lysiert und die DNA über Renografingradienten fraktioniert. Die Membranfraktion wurde gesammelt, gebundene DNA wurde unter Ausnutzung der Pronase P- und Sarkosylsensitivität von Membranbestandteilen befreit und in 5-20 %igen Sucrosegradienten zur Größenbestimmung zentrifugiert (Abb. 5). Obwohl man durch die Reisolierungsprozedur Radioaktivität verliert und man möglicherweise bei der Fällung gegen kleine DNA selektioniert, so ist doch klar erkennbar, daß Moleküle von etwa

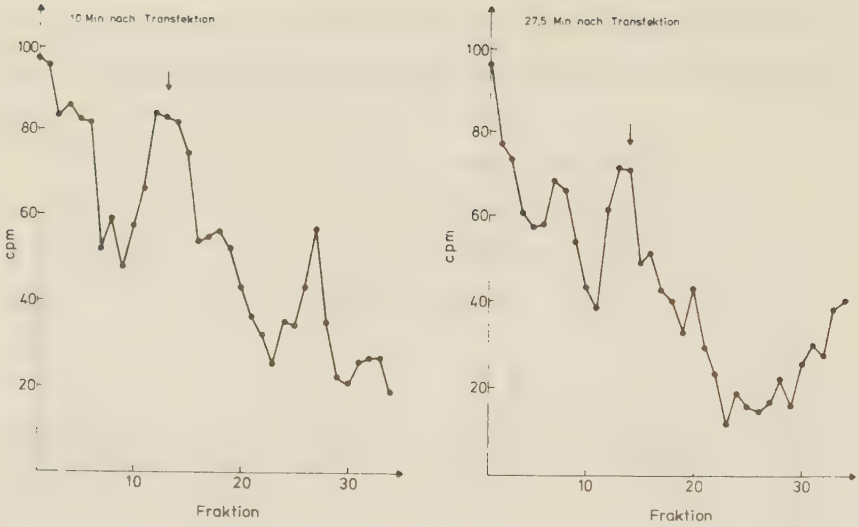


Abbildung 5: Sedimentationsanalyse von der Membran reisolierter Moleküle nach 10 bzw. 27,5 min Transfektion in 5-20 %igen Sucrosegradienten.

SPP1 Größe und multimere Formen an die Membran gebunden sind, d.h. Replikationsintermediate befinden sich dort und nicht in der Cytoplasmafraktion, wo nur niedermolekulare Phagen-DNA zu finden ist.

Zur Kontrolle, ob die reisolierte DNA große Einzelstrangenden, die die Dichte erhöhen könnten, besitzt, wurde die in einem Parallelversuch gewonnene gesamte Membran-DNA in einem neutralen CsCl-Dichtegradienten analysiert, wo sie aber identisch mit zugesetzter, intakter ^{14}C-SPP1 DNA bandete.

3.2 Membranbindung infizierender SPP1 DNA

3.2.1 Nachweis von Membranbindung bei Infektion mit SPP1

Da der Aufnahmemechanismus von DNA bei Infektion gänzlich von dem bei Transfektion verschieden ist (Injektion/Penetration), kann man nicht von vornherein Ähnlichkeit im Membranbindungsverhalten infizierender DNA erwarten. Im folgenden Versuch wurden Zellen des Stammes 222 mit ^{14}C-SPP1 Phagen infiziert und 3 min nach Infektion lysiert und fraktioniert (Abb. 6).

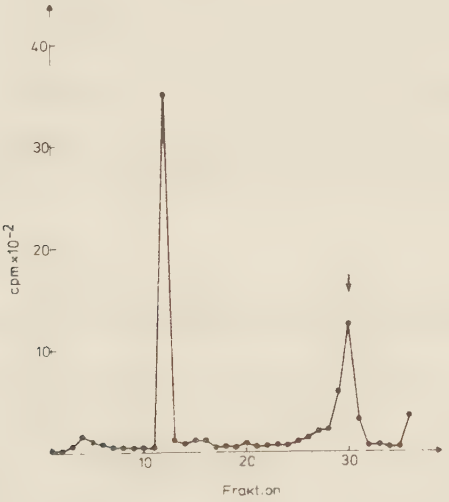


Abbildung 6: Renografinfraktionierung von DNA aus 222 Zellen, 3 min infiziert mit ^{14}C-SPP1.

Im Gegensatz zur Transfektion (Abb. 1) wird infizierende DNA nicht in zwei, sondern in drei Fraktionen aufgetrennt: membrangebundene DNA, abgebaute DNA (in diesem Beispiel sehr wenig) und - neu bei Infektion - nicht-gebundene DNA, die an der Position nativer Moleküle bandet. Ivarie und Pêne (1973) er-

hielten mit infizierender Ø29 DNA ein ähnliches Bild, ebenso Kohler (1976) mit SP82 G DNA.

3.2.2 Erfordert die Komplexbildung bei Infektion Replikation, RNA- oder Proteinsynthese?

Bei Transfektion konnte die Komplexbildung nicht inhibiert werden. Infiziert man 222 oder dnaB ts134 Zellen, die mit HPUra, Rifampicin oder Chloramphenicol 10 min vorinkubiert waren, 4 min bei 37° bzw. 30° mit ^{3}H-SPP1, so stellt man ebenfalls keine Verminderung der Menge membrangebundener DNA fest (nicht gezeigt). Auch hier scheint die Bindung von bereits vor Infektion vorhandenen Strukturen mit geringem turnover abzuhängen. In einem Reisolierungsversuch von gebundener DNA sollte festgestellt werden, welche Art von Molekülen sich an der Membran befinden.

3.2.3 Charakterisierung der gebundenen DNA nach Infektion

Infizierende, nicht-gebundene DNA wurde bis jetzt an der Position nativer SPP1 DNA im Renografingradienten gefunden. Reisoliert man nach Renografinfraktionierung von Lysaten aus infizierten Zellen DNA mit Pronase P und Sarkosyl von der Membran und zentrifugiert sie zur Größenbestimmung mit einer Referenz von ^{14}C-SPP1 DNA in 5-20 %iger, neutraler Sucrose, so erhält man monomere DNA und deren Bruchstücke (Abb. 7). Zentrifugiert man diese DNA in CsCl-Gradienten, so entspricht die Dichte der normaler SPP1 DNA.

3 min nach Infektion zeigte sich an der Membran noch keine replizierende DNA. Um festzustellen, ob diese in Membranbindung

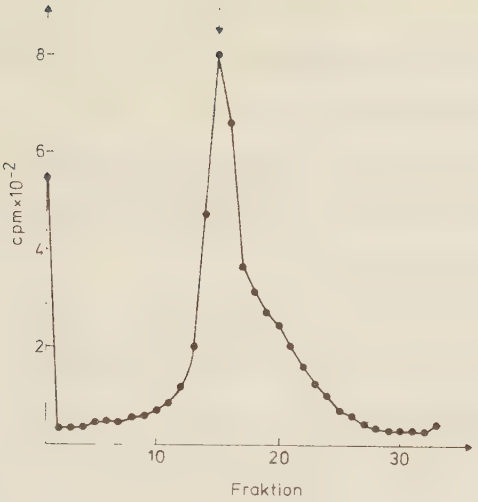


Abbildung 7: Sedimentationsanalyse von der Membran reisolierter Moleküle 3 min nach Infektion mit ^{3}H-SPP1 in einem 5-20 %igen Sucrosegradienten.

entsteht, mußte der ungefähre Zeitpunkt des Starts der Replikation ermittelt werden. Dazu war es notwendig, ein Markierungssystem für replizierende Phagen-DNA aufzubauen.

Die Ergebnisse zur Bestimmung des Schicksals transfizierender und infizierender, parentaler DNA im Hinblick auf ihre Bindung an die Zellmembran lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1) Sowohl nach Transfektion wie nach Infektion geht parentale DNA eine Bindung mit Membranen der Wirtszelle ein. Diese Bindung äußert sich in einer Änderung des Sedimentationsverhaltens der DNA in Renografingradienten und ist bei Transfektion von der Kompetenz der Zellen abhängig. T3 DNA wird von kompetenten Zellen ebenfalls gebunden.

2) Die Beteiligung von Membranen am Komplex wird durch die geringe Gleichgewichtsdichte des Komplexes im Gradienten sowie durch die Phospholipase C-, die Pronase P- und die Sarkosylsensitivität deutlich.

3) Die Komplexbildung ist bei Transfektion und Infektion nicht hemmbar durch Inhibitoren der Replikation, der Transkription oder der Translation.

4) Aus der Membranfraktion reisolierte Moleküle haben bei Transfektion hauptsächlich die Größe monomerer und multimerer DNA, während kurz nach Infektion im wesentlichen monomere SPP1 DNA mit der Membran assoziiert ist. Ungebundene DNA ist bei Transfektion wesentlich kleiner als monomere, während bei Infektion ein großer Anteil der nicht gebundenen Moleküle Einheitslänge besitzt.

Das Verhalten replizierender DNA nach Infektion soll Gegenstand der nachfolgenden Abschnitte sein.

3.3 Markierungssystem für replizierende SPP1 DNA

Wirts-DNA-Synthese wird nach SPP1 Infektion offensichtlich nicht aktiv gestoppt, wie z.B. in øe-infizierten B. subtilis-Zellen (Lavi und Marcus, 1972) oder nach Infektion von E. coli mit dem Phagen T7 (Sadowski und Kerr, 1970). Da man deshalb nach Gabe von ^{3}H-TdR zu infizierten Zellen markierte Phagen- von markierter Wirts-DNA nicht unterscheiden kann, könnte man versuchen, die Phagen-DNA über isopyknische Gradientenzentrifugation von Wirts-DNA abzutrennen, wenn man vorher die Dichte der Phagen-DNA durch Einbau von schweren Isotopen erhöht, da SPP1

DNA dieselbe Dichte wie B. subtilis-DNA hat (Riva, 1968). Das ist für Routineuntersuchungen zu umständlich; außerdem akzeptiert der Phage, wie in eigenen Vorversuchen und von anderen (Schlaeger, 1973; Ganesan, pers. Mitteilung) festgestellt wurde, kaum Dichte-markierte DNA-Bausteine. Es mußte ein anderer Weg gefunden werden, virale replikative DNA zu markieren.

3.3.1 B. subtilis dnaB ts134 erlaubt selektive Phagenmarkierung

Der Phage SPP1 ist weitgehend von seinem Wirt abhängig. Virusproduktion ist während des ganzen Zyklus sensitiv gegenüber Rifampicin und Streptolydigin (Milanesi und Cassani, 1972), woraus geschlossen werden kann, daß mindestens die ß-Untereinheit der Wirts-RNA-Polymerase bei der Virustranskription verwendet wird. Auch in der Replikation wird eine Wirtspolymerase benutzt, die Polymerase III, was klar an dem mutagenen Effekt einer Mutator-Polymerase III auf infizierende SPP1 DNA zu erkennen ist (Montenegro et al., 1976); außerdem ist der Phage sensitiv gegen HPUra, wohingegen die Phagenreplikation in einem Wirt mit resistenter Polymerase trotz Anwesenheit des Inhibitors ungestört verläuft (Ganesan et al., 1976). Um selektiv die Phagen-DNA markieren zu können, war eine Wirtsfunktion zu finden, die für B. subtilis-Replikation essentiell ist, für Phagenreplikation aber nicht.

Die dnaB-Funktion von B. subtilis wird für die Initiation der Replikation benötigt (Burnett und Wake, 1977). Der Stamm B. subtilis dnaB ts134 kann bei Temperaturen über 44° keine neue DNA-Replikationsrunde initiieren (M. Young, pers. Mitteilung). Infiziert man diesen Stamm nach 40 min Vorinkubation bei 45°, in

der begonnene Replikationsrunden beendet werden, mit SPP1, so erhält man - verglichen mit uninfizierten Zellen - einen beträchtlichen Einbau von ^{3}H-TdR.

Canosi et al. (1976) zeigten, daß Nalidixinsäure (Nal) keinen signifikanten Einfluß auf die SPP1 Replikation hat, während die bakterielle DNA-Synthese inhibiert ist. Gibt man zu dnaB ts134-Zellen nach 25 min Inkubation bei 45° 50 µg Nal/ml und infiziert nach weiteren 15 min mit SPP1, so erhält man zwar eine Nal-bedingte leichte Abnahme im Einbau von ^{3}H-TdR in infizierte Zellen, aber auch der Einbau in uninfizierte Zellen ist weiter reduziert, so daß bei den meisten nachfolgenden Versuchen Nal eingesetzt wurde, wo es darauf ankam, möglichst niedrigen Einbau in Wirts-DNA zu erhalten. Abb. 8 zeigt Einbaukinetiken von

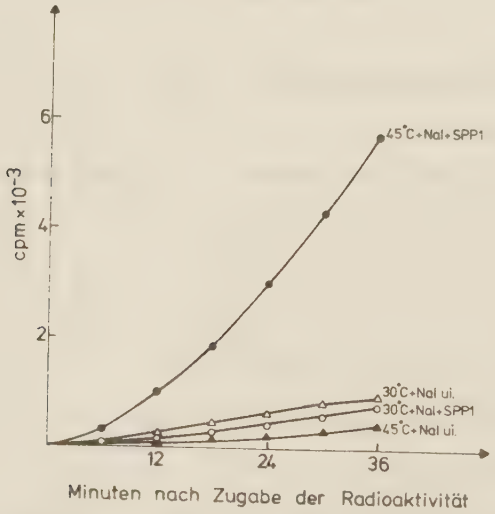


Abbildung 8: Einbaukinetiken von ^{3}H-TdR in SPP1-infizierte und uninfizierte dnaB ts134-Zellen bei 30° und 45° in Gegenwart von Nal. Die Versuchsbedingungen sind unter Variation der obigen Parameter in 2.15 beschrieben.

SPP1-infizierten und nicht-infizierten dnaB ts134-Zellen bei 30° und 45° in Gegenwart von Nal. Bei 45° ist phagenspezifischer ^{3}H-TdR-Einbau möglich, wohingegen die DNA-Synthese des Phagen bei 30° in Gegenwart von Nal nicht möglich zu sein scheint, im Unterschied zu der von Canosi et al. beschriebenen Situation. Wie später gezeigt wird, ist bei 45° in Gegenwart von Nal Phagenvermehrung möglich.

3.3.2 Kontrollen für das Markierungssystem

Erhöhter Einbau in phageninfizierte Zellen kann auf Artefakte wie Permeabilitätssteigerung der Zellmembran zurückzuführen sein. In Abb. 9 wird der Einbau von infizierten, uninfizierten und in Gegenwart von HPUra infizierten Zellen gegenübergestellt. HPUra

Abbildung 9: 150 µg HPUra/ml hemmt den ^{3}H-TdR-Einbau in infizierte Zellen (▲—▲). SPP1 infizierte Zellen ohne HPUra (●—●), uninfizierte Zellen (○—○).

unterdrückt den Einbau von ^{3}H-TdR gänzlich. Dies war für SPP1-spezifischen Einbau erwartet worden. Ebenso niedrig ist die Inkorporation von ^{3}H-TdR, wenn man vor Infektion die Phagen mit UV-Licht oder Antiserum inaktiviert.

Eine weitere Kontrolle für phagenspezifischen Einbau besteht darin, die ^{3}H-TdR-Inkorporation in Abhängigkeit von den Restriktionseigenschaften der Wirtszellen zu prüfen. Dazu wurde ein B. subtilis-Stamm konstruiert (KB1), der neben der dnaB ts134 Mutation das BsuR Restriktions/Modifikationssystem trägt. Infektion von KB1 mit modifizierten Phagen (SPP1·R) resultiert in gleich gutem Einbau wie Infektion des Ausgangsstammes mit unmodifizierten Phagen (SPP1·0), wohingegen Infektion von KB1 mit SPP1·0 selbst bei einer Multiplizität von 20 Phagen pro Bakterium nur den Einbau von uninfizierten Zellen aufweist (Abb. 10).

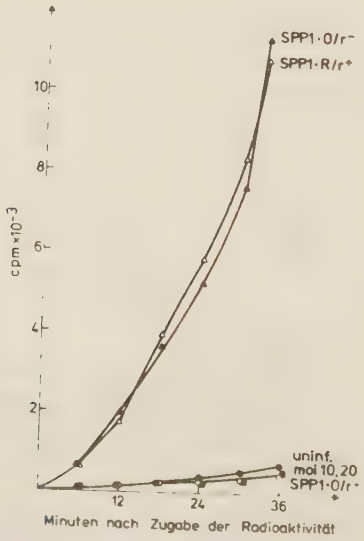


Abbildung 10: Abhängigkeit des ^{3}H-TdR-Einbaus in SPP1·0- und SPP1·R-infizierte Zellen von den Restriktionseigenschaften des Wirts.

Später zu schildernde quantitative Reisolierungen markierter DNA werden den direkten Beweis erbringen, daß es sich hierbei um SPP1 DNA handelt.

3.3.3 Biologische Tests mit dem Markierungssystem

Die in Abb. 8 dargestellten Kinetiken zeigen guten Einbau in infizierte Zellen unter nicht-permissiven Bedingungen für Wirtsreplikation. Weiterhin geht aus den Markierungskontrollen hervor, daß dieser Einbau spezifisch für SPP1 Replikation ist. Zur Untersuchung von Phagenreplikation wäre diese Methode dennoch nicht sehr geeignet, wenn sie Wirt oder Virus so schädigten, daß die Infektion abortiv wäre, d.h. keine Nachkommenphagen produziert würden. In Einstufenkurven konnte jedoch ermittelt werden, daß Phagenvermehrung stattfand, wobei die Wurfgröße

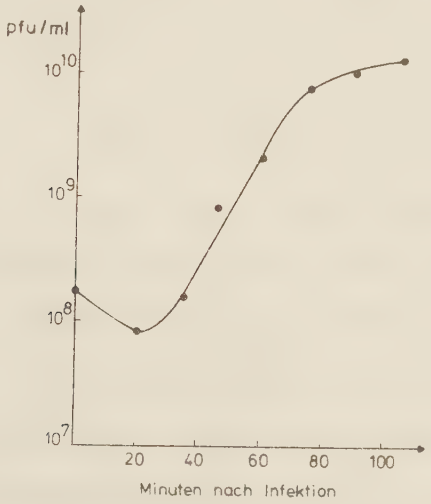


Abbildung 11: Einstufenkurve der SPP1 Vermehrung in dnaB ts134 unter für Wirtsreplikation nicht-permissiven Bedingungen.

nicht sehr gegenüber permissiven Bedingungen in Wildtyp-Zellen reduziert war. Die Einstufenkurve in Abb. 11 wurde mit einer Input-Phagenmultiplizität von 0,4 Phagen pro Zelle erhalten. Aus ihr läßt sich eine Wurfgröße von etwa 80 Phagen pro infizierter Zelle ablesen.

Ein weiterer Hinweis, daß die Wirtszellen unter diesen Markierungsbedingungen kaum geschädigt werden, ist in der hohen Zahl von Überlebenden dieser Behandlung bei uninfizierten Zellen zu sehen: nach 90 min Inkubation bei 45° in Gegenwart von NaI wurden immer noch 50 % Überlebende gemessen.

3.3.4 Die Membran ist Syntheseort für replizierende SPP1 DNA

Ivarie und Pène (1973) konnten zeigen, daß die DNA des Phagen Ø29 an der Membran repliziert und daß für die Membranbindung sogar ein phagenspezifisches Produkt verantwortlich ist. Bei Ø29 bedarf es also einer RNA- und Proteinsynthese, um die DNA in der Membran zu verankern, was sicherlich bei SPP1 nicht der Fall ist, da die Bindung auch ohne Synthese erfolgt (siehe 3.2.2).

In einem Kontrollversuch, bei dem mit Ø29 in Gegenwart von HPUra infiziert wurde, konnte ^{3}H-TdR, 10 min nach Infektion gegeben, in der Membranfraktion wiedergefunden werden (Abb. 12). (Ø29 wird von HPUra nicht gehemmt, da dieser Phage für eine eigene, HPUra-resistente DNA-Polymerase kodiert.) Die korrekte Anwendung der Lyse- und Zentrifugationstechnik zum Nachweis und zur Lokalisierung neu-synthetisierter DNA ist damit durch dieses von SPP1 unabhängige Experiment geprüft.

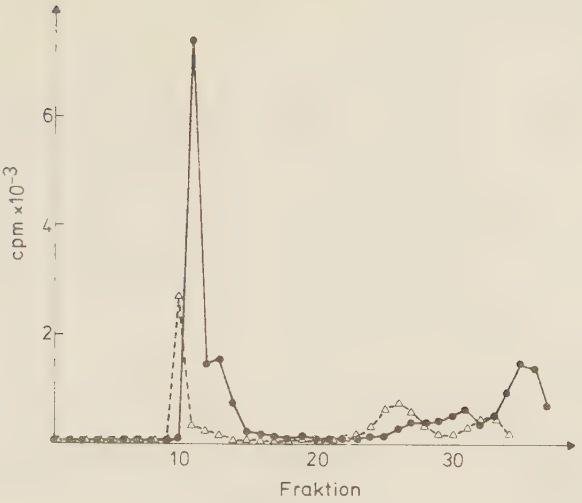


Abbildung 12: Membranbindung replizierender Ø29 DNA. 1 ml PB566/2-Zellen (3 x 10^8/ml) in TY + 1 mM $CaCl_2$ + 5 µg Thymin/ml wurde nach 10 min Vorinkubation (37°) mit 50 µg HPUra/ml mit einer input-Multiplizität von 7 Phagen pro Zelle infiziert und nach weiteren 10 min für 90 sec mit 20 µCi ^{3}H-TdR/ml markiert (●——●). Ein nicht-infizierter Kontrollansatz (Δ----Δ) wurde identisch behandelt. Die Lysate wurden über separate Renografin-gradienten fraktioniert.

Gibt man zu SPP1-infizierten dnaB ts134 Zellen unter den beschriebenen Bedingungen 15 min nach Infektion einen Puls von ^{3}H-TdR, so findet man bei einer sofort entnommenen Probe die ganze Markierung in der Membranfraktion, d.h. SPP1 DNA wird in Membranbindung synthetisiert, was den Versuch von 3.2.3 weiterführt, in dem analysiert werden sollte, wo Replikationsintermediate nach Infektion synthetisiert werden. (Da bei Renografingradienten meistens Gesamtradioaktivität bestimmt wurde, findet man die säurelösliche Radioaktivität am Meniskus des Gradienten).

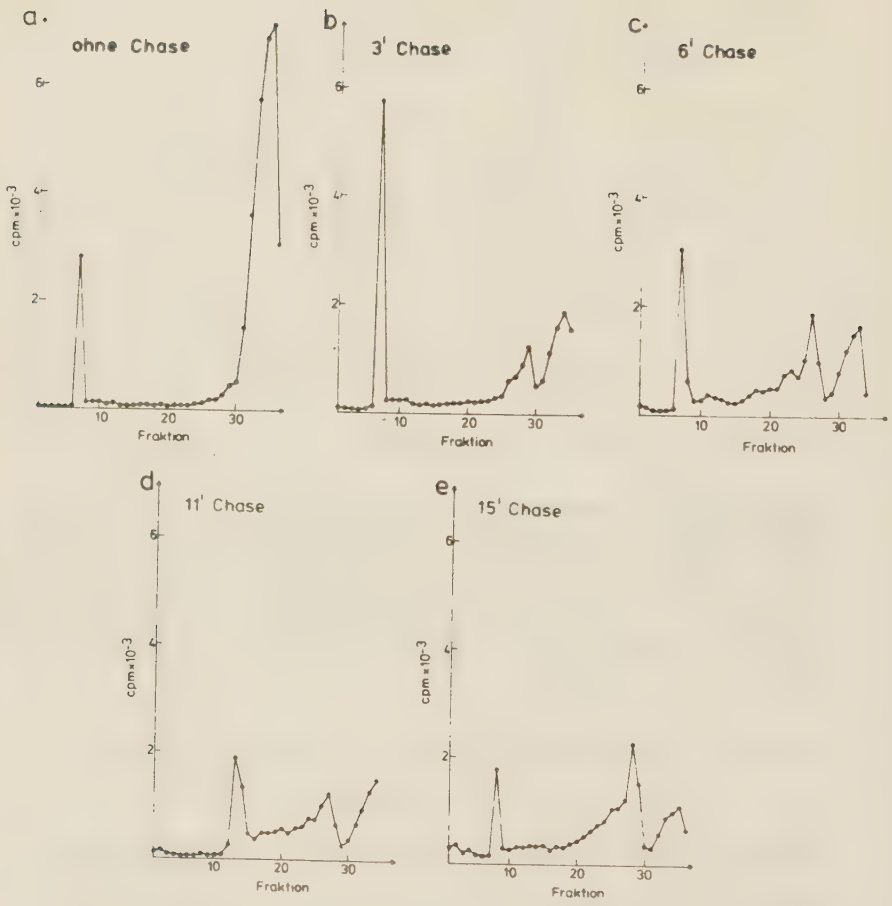


Abbildung 13: SPP1 DNA wird an der Membran synthetisiert und löst sich nach Chase von ihr ab. 10 ml dnaB ts134 Zellen in HIIIM-Medium, vorbehandelt wie in 2.11 beschrieben, wurden 15 min nach Infektion für 30 sec mit 8 µCi ^{3}H-TdR/ml markiert, der Puls mit 100 µg unmarkiertem TdR/ml gestoppt, nach den angegebenen Zeiten die Proben entnommen und die Lysate auf Renografingradienten analysiert. (Durch die Viskosität des Membranmaterials bedingt, wurde komplexierte DNA oftmals nur in einer Fraktion gesammelt.)

Nach starker Verdünnung der Radioaktivität mit unmarkiertem TdR sieht man bei einer nach 3 min "Chase" entnommenen Probe, daß die Membranfraktion durch Inkorporation des größten Teils der zuvor noch säurelöslichen Markierung noch stärker markiert ist, während sich gleichzeitig von der Membran neu-synthetisierte DNA ablöst. In den nachfolgenden Chase-Zeiten nimmt die Markierung der Membranfraktion ab, während die Menge freigesetzter DNA zunimmt (Abb. 13).

Die Synthese von SPP1 DNA an der Membran und die Freisetzung neu-synthetisierter DNA von ihr zeigt ein weiteres Mal, daß die Membranbindung von Phagen-DNA nicht auf Einschließen in Membranen zurückzuführen ist, sonst könnte nie Ablösung von der Membran beobachtet werden.

3.3.5 Charakterisierung der an der Membran synthetisierten DNA

Infizierte und pulsmarkierte Zellen wurden lysiert und mit Renografin fraktioniert. Ein Teil der Zellen wurde vor der Lyse mit einem Überschuß an unmarkiertem TdR für 15 min weiterinkubiert und ebenfalls fraktioniert. Man erhielt bei den gleich nach dem Puls fraktionierten Zellen Synthese an der Membran wie in Abb. 13a, bei den nach 15 min Chase fraktionierten Zellen war die Radioaktivität nicht nur an der Membran, sondern hauptsächlich in freier Form wiederzufinden, analog zu Abb. 13e. Das Material der Membranfraktionen wurde mit Pronase P und Sarkosyl behandelt und in 5-20 %igen, neutralen Sucrosegradienten analysiert. Desgleichen wurden die oberen Fraktionen (ab Fraktion 21) der Renografingradienten, die freie DNA enthielten, zusammengefaßt, mit Äthanol gefällt, resuspendiert und ebenso

in Sucrose zentrifugiert (Abb. 14). Die Pulsmarkierung geht in der Membranfraktion hauptsächlich in großes Material, aber auch

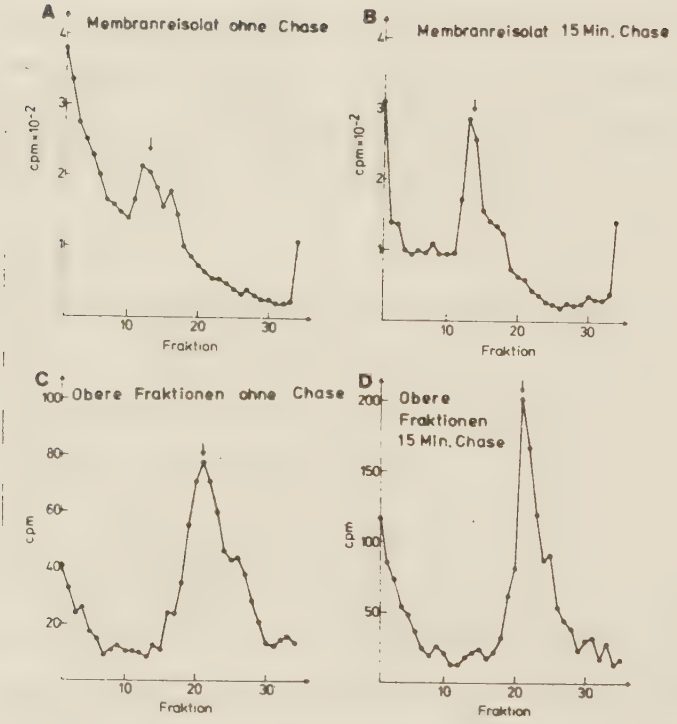


Abbildung 14: Sedimentationsverhalten von reisolierter DNA aus Membrankomplexen und von freier DNA, markiert mit einem 30 sec-Puls an ^{3}H-TdR, 15 min nach Infektion, bzw. analysiert nach weiteren 15 min Chase. Pfeile geben wie in allen anderen Gradienten die Referenzposition von nativer SPP1 DNA an.

in Material von SPP1 Größe (a). Nach 15 min Chase ist das meiste des großen Materials zu monomerer DNA prozessiert (b). Die gesammelten oberen Fraktionen des Renografingradienten zeigen dagegen nur DNA der SPP1 Einheitslänge, sowohl direkt beim Puls (c) - etwas freie DNA ist auch hier markiert - als auch nach 15 min Chase (d). Die schon bei Transfektion an der Membran gefundenen Replikationsintermediate können auch hier in Membranbindung, aber nicht in freier Form gefunden werden.

3.4 Sucrosegradienten mit selektiv markierter DNA

Die Markierungsmethode für replizierende SPP1 DNA ermöglichte es, die Membran als Syntheseort für Phagen-DNA zu bestimmen. Bei den eben geschilderten Reisolierungen replizierender DNA von der Membran wurden große Replikationsintermediate entdeckt. Durch Verluste bei der Reisolierung war die Radioaktivität in den Sucrosegradienten sehr niedrig und Größenbestimmungen zu ungenau. In folgenden Versuchen sollen deshalb unabhängig von ihrer Membranbildung replikative Strukturen (mit einer anderen Lysemethode gewonnen) in Sucrosegradienten analysiert werden. (In allen Gradienten wurden Gesamtcounts gemessen, um Ab- und Umbau von Markierung verfolgen zu können.)

3.4.1 Pulsmarkierte DNA in r^+/r^- - Stämmen

Aus den Kontrollen für das Markierungssystem (3.3.2) ging hervor, daß phagenspezifischer Einbau nicht möglich ist unter Bedingungen, in denen das Phagengenom restringiert wird. Wenn das große Material aus Abb. 14 a) Zwischenformen replizierender SPP1 DNA darstellt und nicht etwa DNA eines in geringer Frequenz

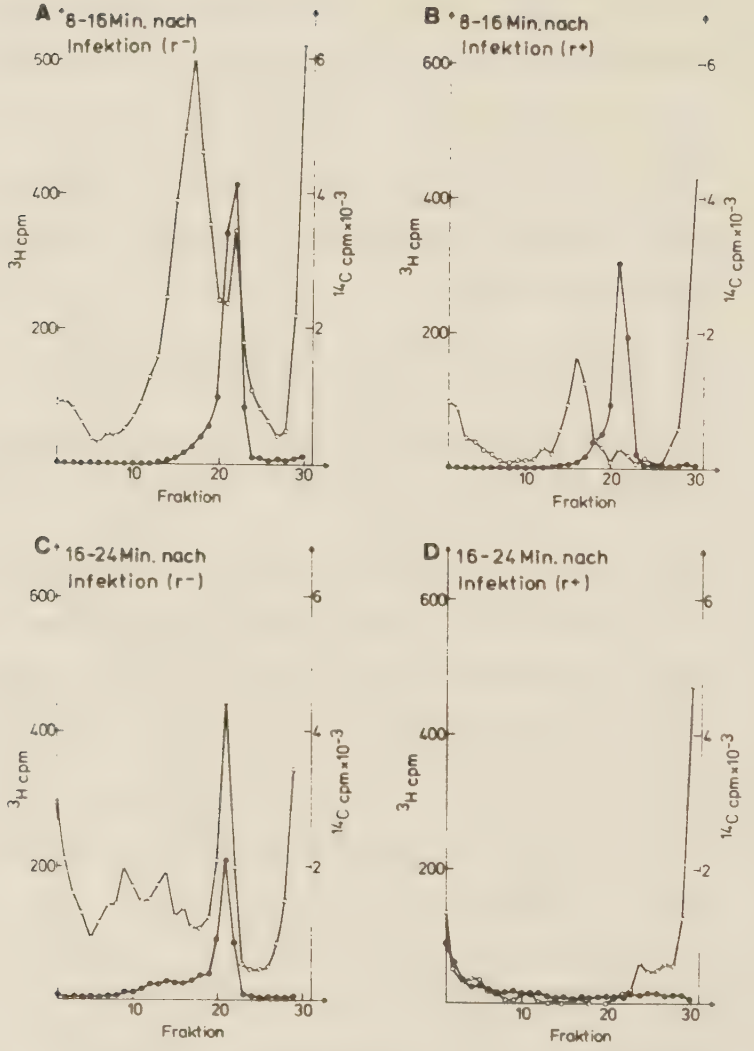


Abbildung 15: Sedimentation neu-synthetisierter ^{3}H-DNA (O——O) und parentaler ^{14}C-DNA (●——●) nach Infektion von dnaB ts134 (r^-) und KB1 (r^+) mit ^{14}C-SPP1.0. Pulse an ^{3}H-TdR (10 µCi/ml) wurden in den angegebenen Zeiten gesetzt.

induzierten, großen lysogenen Phagen wie SPß (Zahler et al., 1977), die evtl. später fragmentiert wird, so sollte es nach Infektion eines restringierenden Stammes mit unmodifizierten Phagen nicht synthetisiert werden.

Im nächsten Versuch wurden restringierende (KB1) und nicht-restringierende (Ausgangsstamm dnaB ts134) Wirtszellen mit ^{14}C-SPP1·0 infiziert und ein Puls an ^{3}H-TdR 8-16 bzw. 16-24 min nach Infektion gegeben. Die DNA wurde komplett deproteinisiert und auf neutralen 5-20 %igen Sucrosegradienten analysiert. Abb. 15 zeigt das Sedimentationsmuster von neu-synthetisierter und parentaler DNA nach Infektion des r^- bzw. r^+ - Stammes mit ^{14}C-SPP1·0. Auffallend ist der ausgeprägte Peak an schneller sedimentierender DNA in Diagramm a), der in c) weitgehend zugunsten monomerer DNA abgebaut ist. Erstaunlich ist, daß beim restringierenden Stamm in der frühen Zeit immer noch eine Restsynthese stattfand, und daß noch viel Phagen-DNA anscheinend unversehrt vorhanden war (b). Bei der späteren Zeit im r^+ - Stamm gibt es weder Restsynthese noch parentale DNA (d). Infiziert man Kontrollansätze mit SPP1·R, so erhält man in r^- und r^+ - Stämmen Synthese wie in 15a) und c).

3.4.2 Größe der neu-synthetisierten DNA in Zeitabhängigkeit

Das schnell sedimentierende Material in Sucrosegradienten entsteht in Abhängigkeit von den Restriktionseigenschaften der Wirtszellen. In diesem Versuch sollte ermittelt werden, wann es während der Infektion synthetisiert wird. Dazu wurde der Stamm dnaB ts134 mit ^{14}C-SPP1 Phagen infiziert und in 4 Proben nacheinander vier 8-min-Pulse an ^{3}H-TdR gegeben (Abb. 16). Der

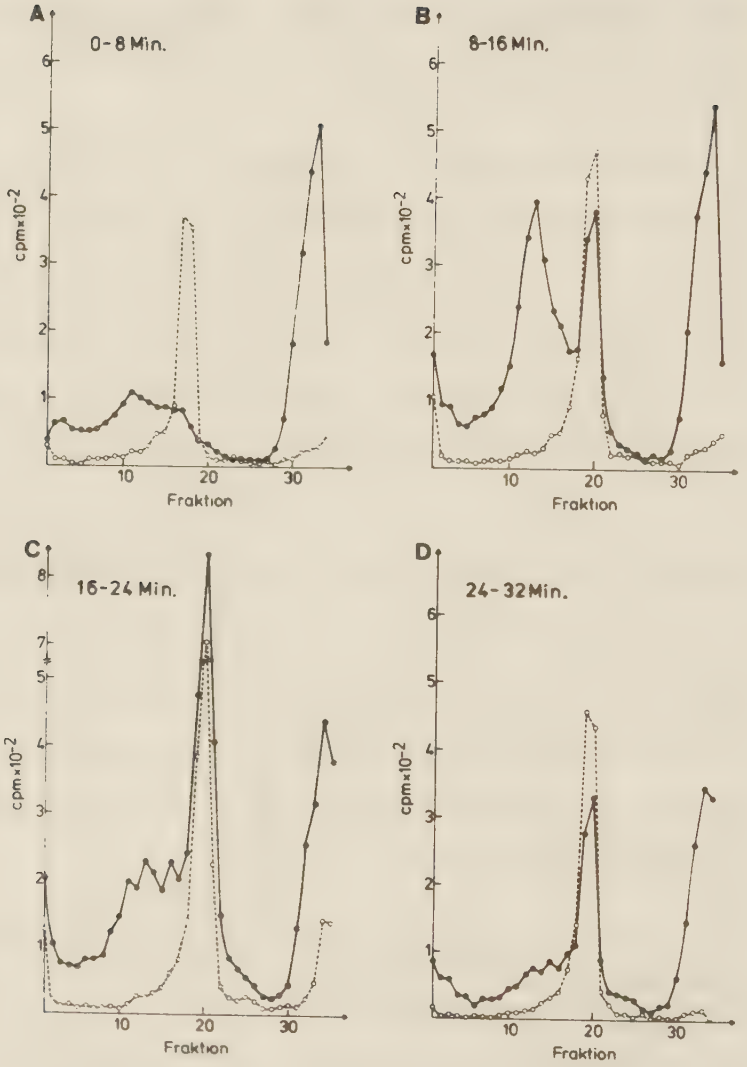


Abbildung 16: Sedimentation neu-synthetisierter ^{3}H-DNA (●——●) und parentaler ^{14}C-DNA (O---O) nach Infektion von dnaB ts134 mit ^{14}C-SPP1 in Abhängigkeit von der Zeit des Pulses (10µCi/ml, 8 min).

früheste Puls geht hauptsächlich in großes Material mit heterogener Verteilung, der zweite Puls zeigt das schon aus Abb. 15a) bekannte Bild mit einem relativ scharfen Peak, der etwa eine Größe von Di- bis Trimeren repräsentiert (ähnlich wie bei Transfektion, wo auch noch größere Aggregate gefunden wurden; R. Kahmann, 1974) und Synthese in monomere DNA. Die späten Pulse gehen hauptsächlich in monomere DNA und die Synthese in großes Material wird vernachlässigbar. Bei den frühen Zeiten fällt auf, daß sich sehr wenig ^{14}C-Markierung an der Stelle des großen ^{3}H-Materials befindet. Das kann durch Beteiligung nur weniger parentaler DNA-Moleküle an der Replikation erklärt werden.

3.4.3 Ist schnell sedimentierende DNA eine konkatemere Form von SPP1 DNA?

Der Nachweis, daß schnell sedimentierende DNA ebenfalls SPP1 DNA ist, wurde bis jetzt nur über die Kontrollen des Markierungssystems erbracht. Dieser indirekte Befund wird durch folgenden Puls-Chase Versuch bestätigt: 8 ml SPP1-infizierten Zellen wurden 5 min nach Infektion ein 5-minütiger Puls von ^{3}H-TdR gegeben, die Radioaktivität mit unmarkiertem TdR verdünnt und die erste 2 ml - Probe entnommen. In Abständen von jeweils 5 min folgten die drei ebenfalls 2 ml umfassenden Chase-Proben. Die Lysate aller Proben wurden in 5-20 %igen Sucrosegradienten zentrifugiert (Abb. 17). In der Pulsprobe befindet sich wie erwartet neben monomerer auch schnell sedimentierende DNA. Diese wird innerhalb der anschließenden 15 min Chase in DNA von SPP1 Größe umgewandelt; es handelt sich also sicherlich um eine konkatemere Form von SPP1 DNA, die später zu Einheitslänge geschnitten wird.

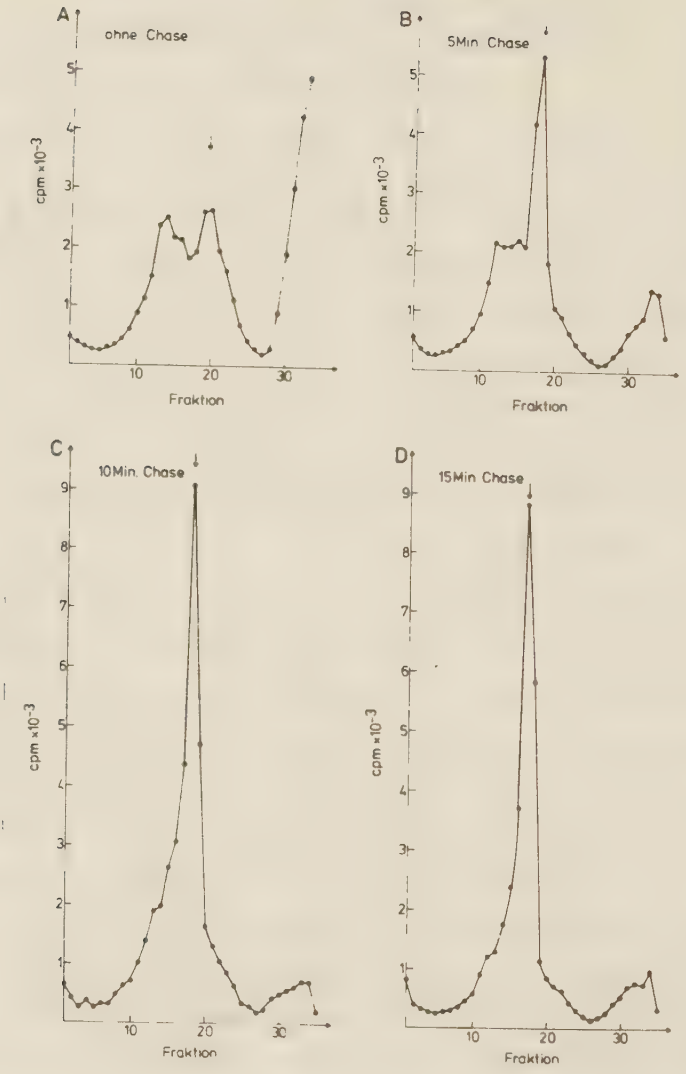


Abbildung 17: Puls-Chase-Versuch zur Analyse der Umwandlung schnell sedimentierenden Materials nach SPP1 Infektion von dnaB ts134. 5 min nach Infektion wurden 12,5 µCi ^{3}H-TdR/ml zugesetzt und die Radioaktivität nach weiteren 5 min mit unmarkiertem TdR verdünnt. Chase-Proben wurden zu den angegebenen Zeiten entnommen.

3.4.4 Untersuchung der konkatemeren DNA

Zur präparativen Gewinnung schnell sedimentierender DNA aus analog zu Abb. 17a) markierten, (diesmal mit ^{14}C-SPP1) infizierten Zellen, wurde die DNA in Sucrosegradienten aufgetrennt. In einem Gradienten wurde die biologische Aktivität in den Fraktionen mittels Helfertransfektion bestimmt (Abb. 18a). Dabei sollte auf andere Weise bestätigt werden, daß es sich bei dem schnell sedimentierenden Material um SPP1 DNA handelt, und es sollte versucht werden, eine Vorstellung von der Proportion dieser Konkatemeren zu Monomeren im Gradienten zu erhalten.

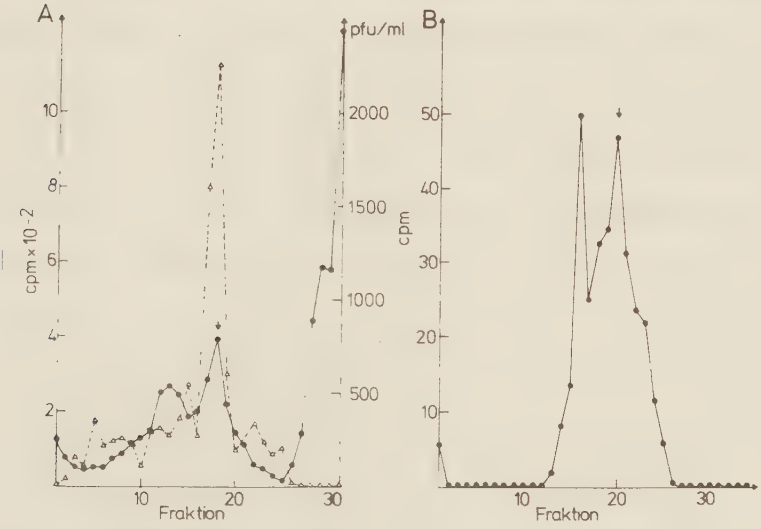


Abbildung 18a: Biologische Aktivität im Helfersystem (Δ---Δ) und Sedimentationsverhalten reisolierter neusynthetisierter ^{3}H-DNA (●——●) nach Infektion von dnaB ts134 mit ^{14}C-SPP1 (Pfeil).

Abbildung 18b: Sedimentationsanalyse des Konkatemerenmaterials auf einem alkalischen Sucrosegradienten. Die Position denaturierter ^{14}C-SPP1-Referenz-DNA im Gradienten ist durch den Pfeil gekennzeichnet.

Die meiste Aktivität findet man in der Position monomerer DNA; die Aktivitätskurve folgt nicht der Radioaktivität bei größeren Molekulargewichten. Dies hat zwei Gründe:

1. befinden sich dort, wie sich herausstellte, die meisten Fragmente von unmarkierter Bakterien-DNA, die die Aufnahme von Phagen-DNA in kompetente Zellen reduzieren;

2. handelt es sich offensichtlich bei den Konkatemeren um relativ wenige, aber mit ^{3}H-TdR hochmarkierte Moleküle, während die meiste biologische Aktivität in den zahlreichen, niedrig mit ^{14}C-markierten parentalen Monomeren steckt.

Aus einem Parallelgradienten des eben gezeigten wurde die Peakfraktion des Konkatemerenmaterials entnommen und auf einem alkalischen Sucrosegradienten analysiert (Abb. 18b). Obwohl die Radioaktivität sehr niedrig ist, erkennt man, daß das Material bei hohen pH-Werten offensichtlich in Stücke von etwa monomeren SPP1-Einzelsträngen zerfällt. Zusätzlich gibt es längere Einzelstrangmoleküle. Die Konkatemere besitzen demnach Einzelstrangbrüche, die in alkalischer Lösung Einzelstränge von ungefähr Monomer-Länge entstehen lassen. Dies ist kein Artefakt der Rezentrifugation, da dasselbe Material bei Rezentrifugation in neutraler Sucrose die alte Sedimentationsgeschwindigkeit beibehält. Die Situation ist etwas unterschiedlich zu der bei Transfektion, wo früh nach Transfektion Moleküle auftreten, die in alkalischer Lösung zu Einzelsträngen von etwa 5×10^{6} Dal zerfallen, während spät nach Transfektion hauptsächlich größere als monomere Einzelstränge, nie aber welche von SPP1 Größe gefunden werden (Kahmann, 1974). Möglicherweise müßte man derartige Strukturen zu noch späterer Zeit in Transfektion suchen.

Der Abschnitt über die Sedimentationseigenschaften neu-synthetisierter SPP1 DNA läßt sich folgendermaßen zusammenfassen: schnell sedimentierende DNA wird - abhängig von den Restriktionsbedingungen - zu frühen Zeiten nach Infektion gebildet und wird zu Monomeren geschnitten (ist also eine konkatemere Form von SPP1 DNA), die bei alkalischem pH in Einzelstränge von SPP1 Länge und größer zerfällt.

3.5 Dichteshiftexperimente zur quantitativen Reisolierung replizierender SPP1 DNA

Die Replikationsformen von SPP1 DNA konnten bisher nur über ihren Syntheseort und ihr Sedimentationsverhalten charakterisiert werden. Für elektronenmikroskopische Untersuchungen waren diese DNA-Präparationen ungeeignet, da sie noch die ganze Wirts-DNA enthielten. Zur Abtrennung der Wirts-DNA konnten Säulen oder präparative Sucrosegradienten nicht verwendet werden, da die bakteriellen DNA-Fragmente etwa die Größe konkatemerer SPP1 DNA besitzen.

3.5.1 Dichteshift der Wirts-DNA mit schwerem Wasser

Wie schon erwähnt, ist es sehr schwierig, SPP1 DNA zu erhalten, die eine Dichtemarkierung trägt. Deshalb wurde versucht, die Wirts-DNA über Deuterium-Markierung und anschließender Dichtegradientenzentrifugation von der zu isolierenden Phagen-DNA abzutrennen. Dazu wurde dnaB ts134 in D_2O-haltigem Medium in Gegenwart von ^{14}C-Thymidin vorgezüchtet. Nach dem Abstellen der Wirtsreplikation bei 45° wurde in H_2O-Medium infiziert und 10 min nach Infektion ein 5-minütiger Puls an ^{3}H-TdR gegeben.

Das aus diesen Zellen erhaltene Lysat wurde über einen CsCl-Dichtegradienten aufgetrennt (nicht gezeigt). Die Abtrennung der ^{14}C-markierten Wirts-DNA von der replizierenden SPP1 DNA war nicht allzu gut, aber ausreichend, um das selektiv markierte Material mit Restriktionsnukleasen zu verdauen, um den direkten Beweis zu erbringen, daß es sich bei diesem Material um SPP1 DNA handelt. Abb. 19 zeigt das Restriktionsmuster der DNA aus den (^{3}H-)Peakfraktionen des Dichtegradienten, die vor der Verdauung mit der Restriktionsendonuklease Eco RI über eine Hydroxylapatitsäule vom CsCl befreit wurde. Das Reisolat besteht, wie der Vergleich zur Referenzspur zeigt, aus SPP1 DNA; kein Hintergrund bakterieller Fragmente ist zwischen den SPP1 Banden zu sehen, d.h. mehr als 90 % der isolierten DNA stammt von SPP1.

Abbildung 19: Eco RI-Verdauung selektiv markierter SPP1 DNA nach Reinigung über CsCl-Dichtegradienten (rechte Spur). Die linke Spur zeigt dieselbe Menge dieser DNA, die zusätzlich in Gegenwart von 1 µg nativer SPP1 DNA verdaut und elektrophoretisiert worden war.

3.5.2 Dichteshift der Wirts-DNA mit 5-Bromuracil

Da der Wirtsstamm dnaB ts134 relativ tolerant gegenüber 5-BU ist (Burnett und Wake, 1977), die Abtrennung von Wirts-DNA mit D_2O dagegen nur mäßig ist, war es naheliegend, die Wirts-DNA mit 5-BU vorzumarkieren. Die zusätzlich mit ^{14}C-BUdR vormarkierte Wirts-DNA ließ sich sehr gut von replizierender SPP1 DNA abtrennen. Abb. 20 a,b zeigt die Profile von CsCl-Dichtegradienten, in denen 13 bzw. 22 min nach Infektion für 20 sec mit ^{3}H-TdR pulsmarkierte SPP1 DNA von ^{14}C-Wirts-DNA abgetrennt wurde.

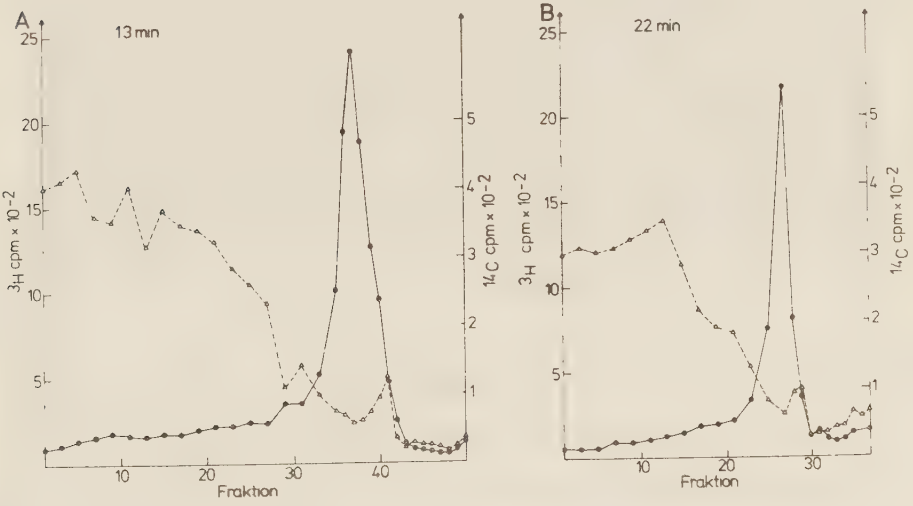


Abbildung 20 a,b: CsCl-Dichtegradienten zur Abtrennung von 5-BU vormarkierter *B. subtilis* DNA (zusätzlich mit ^{14}C-BUdR markiert) (Δ----Δ) von replizierender ^{3}H-SPP1 DNA (●——●).

Fraktion 37 des ersten und Fraktion 27 des zweiten Gradienten wurden zur Elektronenmikroskopie verwendet. Wie aus den analytischen Sucrosegradienten zu erwarten war, findet man beim

frühen Puls konkatemere DNA und DNA von Einheitslänge (Abb. 21 a), während beim späten Puls nur DNA von SPP1 Größe gefunden wurde, wobei aber (bis auf ein Molekül) nicht unterschieden werden kann, ob es sich um replizierende oder parentale DNA handelt.

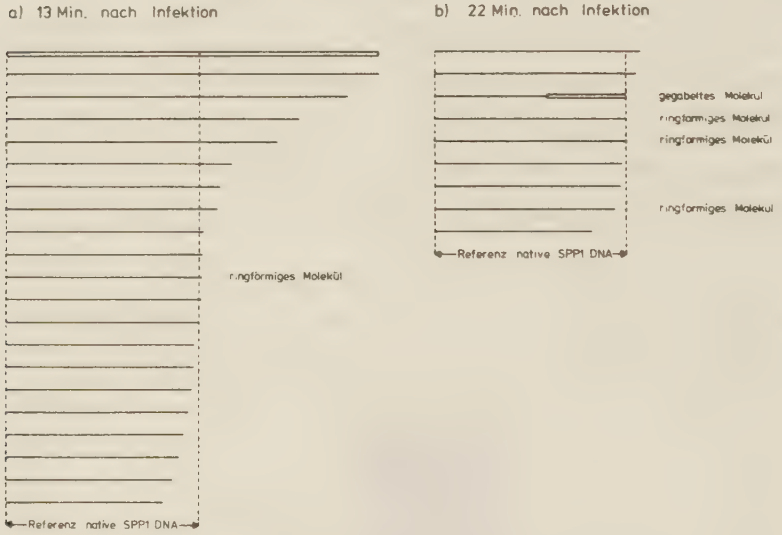


Abbildung 21 a,b: Längen von reisolierten SPP1 DNA-Molekülen 13 bzw. 22 min nach Infektion im Vergleich zu nativer SPP1 DNA.

Des weiteren wurden ringförmige Moleküle gefunden (Abb. 22a) und ein replizierendes lineares Molekül (Abb. 22b).

Da die ringförmigen Moleküle keinerlei lineare Abzweigungen von den Ringen erkennen lassen, wie man es z.B. von rolling circle Replikation kennt, lassen sie sich keinem Replikationsmodell zuordnen; sie können z.B. auch Vorstufen für "theta"-Replikation (Ogawa et al., 1968).

Das replizierende Molekül der späten Zeit ist linear und zu etwa einem Drittel repliziert. Selbst bei Annahme partieller

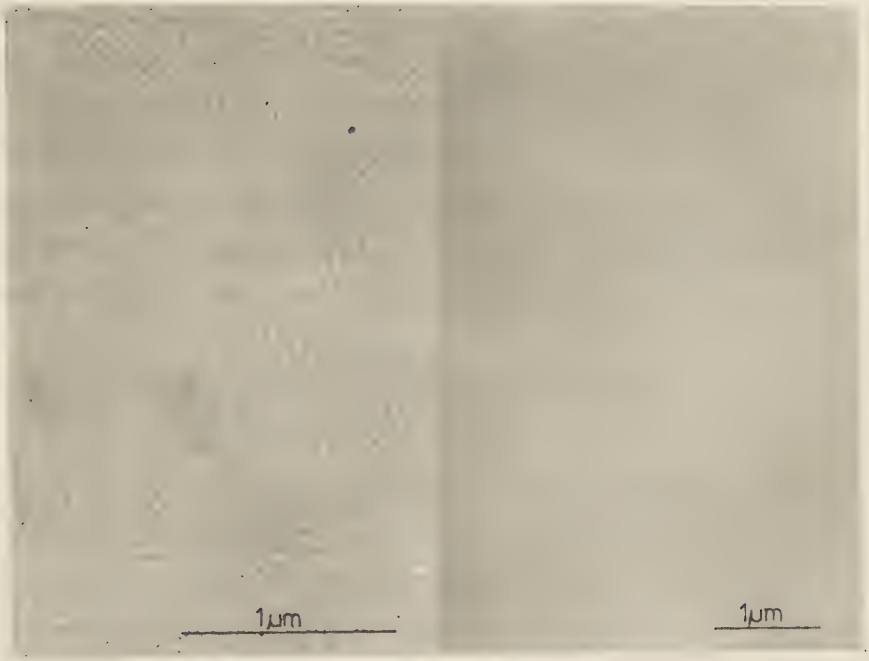


Abbildung 22a

Abbildung 22b

zirkulärer Permutation in der DNA-Population weist die Lage der Gabel auf einen ziemlich exzentrisch gelegenen Origin der DNA-Replikation, was mit den genetischen Daten von Klotz (1973) über die Richtung der SPP1 DNA-Replikation übereinstimmen würde.

3.6 SPP1 Cistren für Phagenreplikation

Nach Untersuchungen über Struktur und Verhalten replizierender SPP1 DNA soll nun ermittelt werden, welche genetischen Erfordernisse die Phagenreplikation stellt.

3.6.1 SPP1 Replikation ist abhängig von Proteinsynthese

Offensichtlich benötigt SPP1 das dnaB-Produkt von B. subtilis nicht zur eigenen DNA-Replikation (darüber hinaus ist er unabhängig von dnaC, dnaG und dnaH, S. Riva, pers. Mitteilung). Es ist denkbar, daß der Phage für eigene Funktionen kodiert, die z.B. neue Initiationsfaktoren liefern oder die Wirtspolymerase III modifizieren (Ganesan, 1976), so daß deren Spezifität verändert wird. Die Bildung derartiger Faktoren sollte Chloramphenicol-sensitiv sein. Gibt man 150 µg Chloramphenicol/ml

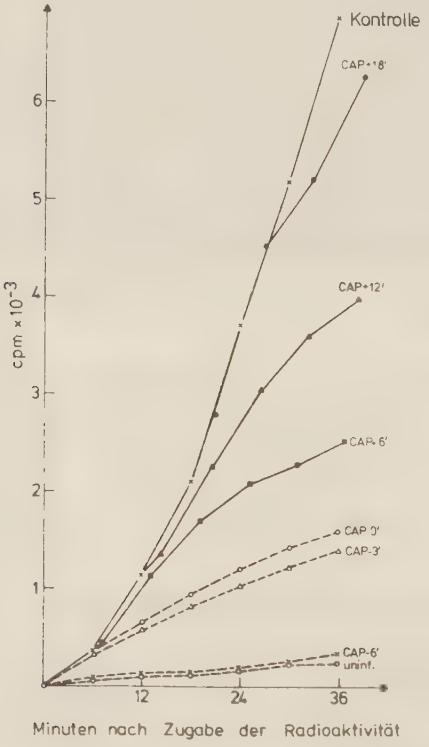


Abbildung 23: Wirkung von Chloramphenicol (CAP) auf die Synthese von SPP1 DNA in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der CAP-Zugabe. Anzucht und Vorbehandlung der Zellen erfolgte hier und in nachfolgenden Einbaukinetiken wie in 2.15 beschrieben. Kontrollansatz erhielt kein CAP.

zur selben Zeit wie die Phagen zu den Zellen, stoppt, wie aus Abb. 23 ersichtlich ist, die Replikation vollständig; Chloramphenicol-Zusatz zu späteren Zeiten vermindert den Hemmeffekt mehr und mehr. Der Inhibitor verhindert demnach die Synthese früher Phagenprodukte, die benötigt werden, um SPP1 Replikation zu starten und aufrechtzuerhalten. Dies ist in Übereinstimmung mit Befunden von Esche (1974), daß die Mutante am109 pleiotrope Wirkung auf die Synthese später Proteine und auf die Replikation hat.

3.6.2 Suche nach temperatursensitiven SPP1-Mutanten, die in der DNA-Synthese geschädigt sind

Das in 3.3 dargestellte Markierungssystem wurde benutzt, um Mutanten zu identifizieren, die unfähig sind, bei 45° ihre DNA zu replizieren. 29 temperatursensitive (ts)-Mutanten aus 25 Cistren wurden dem in Material und Methoden beschriebenen DNA-Synthesetest unterworfen. 10 davon - gruppierbar in 7 Cistren waren ts in der DNA-Replikation, 9 davon zeigen Einbauwerte, die nicht unterscheidbar sind von uninfizierten Proben. Abb. 24 zeigt ein Beispiel der Einbaukinetiken dieser Mutanten im Vergleich zu Wildtyp - Infektion bzw. zu Infektion mit Mutanten, die zur DNA-Synthese fähig sind (wie z.B. tsG19) und zu uninfizierten Zellen. Die ts-Mutanten mit dem Präfix "A" wurden von A.T. Ganesan isoliert und mit einer anderen Methode als dna^- charakterisiert, was bis auf tsA12 und tsA58 bestätigt werden konnte. Die 10 in der Replikation betroffenen ts-Mutanten sind in Abb. 31 eingezeichnet.

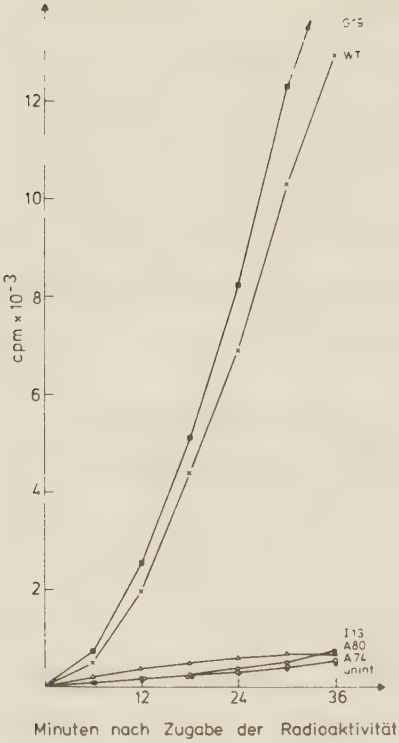


Abbildung 24: Einbaukinetiken von ts-Mutanten

3.6.3 Mutante tsI17

Eine der in der Replikation geschädigten ts-Mutanten, tsI17, zeigte eine von den übrigen 9 Mutanten unterschiedliche Einbaukinetik (Abb. 25). Sie beginnt wie bei Infektion mit Wildtyp-Phagen, knickt aber nach einiger Zeit ab. Dieses Plateau ist wesentlich höher als der Einbau, den man bei Infektion mit dna^- Mutanten wie z.B. tsB3 und tsI20F oder auch in uninfizierten Zellen bei 45° erhält.

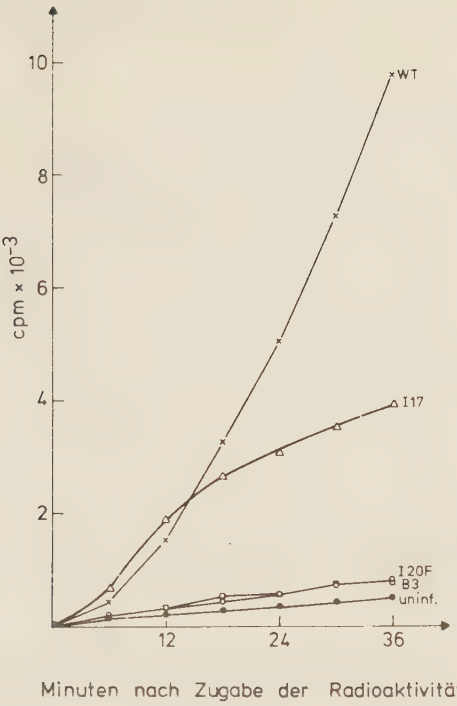


Abbildung 25: Einbaukinetik der Mutante tsI17 im Vergleich zu WT-, tsI20F, tsB3- und uninfizierten Zellen.

Wie sieht das bei 45° synthetisierte Material aus? B. subtilis dnaB ts134, bei 45° infiziert mit tsI17 bzw. Wildtyp SPP1, wurde 8 min nach Infektion ein 1-minütiger Puls an ^{3}H-TdR gegeben, eine Probe jeweils gleich bzw. nach 8 und 16 min Chase entnommen, lysiert und auf neutralen, 5-20 %igen Sucrosegradienten analysiert. Abb. 26 zeigt, daß die markierte tsI17 DNA zur Zeit des Pulses bereits zum Teil aus etwas kleinerem Material als die zugesetzte ^{14}C-SPP1-Referenz besteht und im Verlauf des Chase noch kleiner wird, während sich in der Wildtypkontrolle

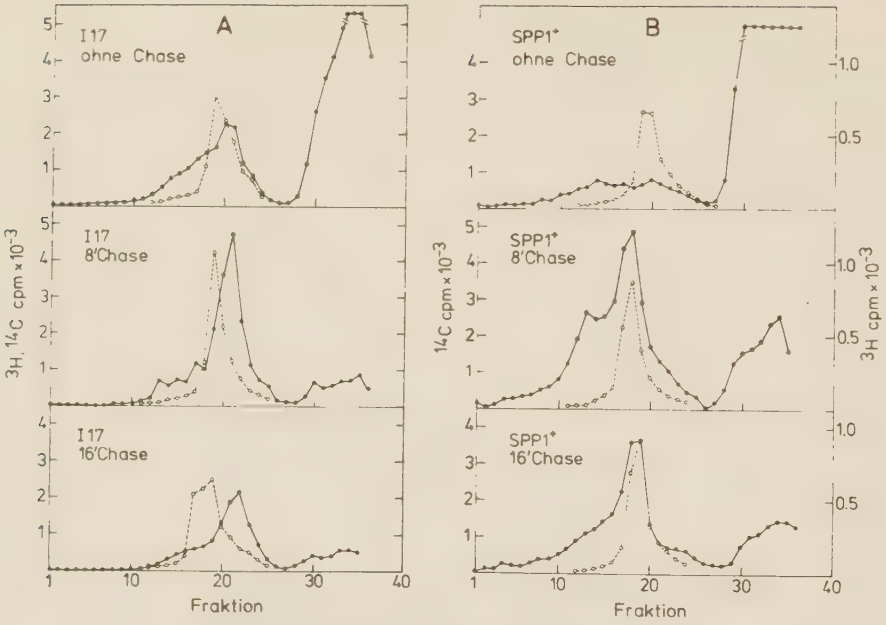


Abbildung 26: Sedimentation von I17- und WT-DNA nach Infektion bei 45° und Puls-Chase. (●——●) ^{3}H-TdR, (O----O) ^{14}C-SPP1 DNA als Referenz.

das meiste Material nach 16 min Chase an der Position von monomerer DNA befindet.

Reisoliert man replizierende I17 DNA zu späten Zeiten nach Infektion bei 45° und Vormarkierung der Wirts-DNA mit Bromuracil über CsCl-Gradienten (siehe 3.5.2), so hat die reisolierte, markierte DNA dasselbe Sedimentationsverhalten wie nicht über CsCl aufgetrennte Proben, d.h. die Reisolierung verläuft quantitativ, und die Moleküle erweisen sich dabei - im Elektronenmikroskop vermessen - im Durchschnitt als kürzer als monomere SPP1 DNA. Abb. 27 zeigt eine Anzahl vermessener Moleküle. Als

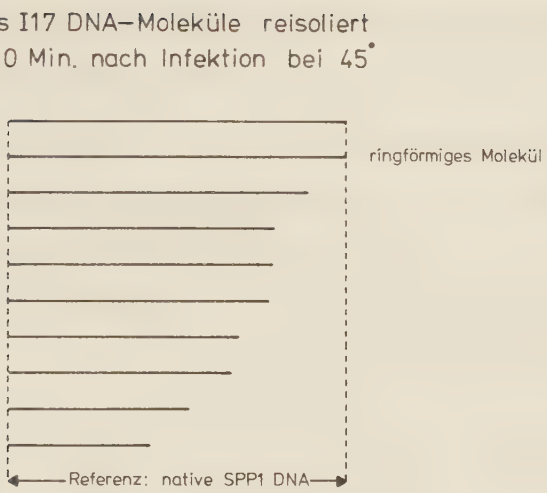


Abbildung 27: Größen reisolierter I17 DNA-Moleküle nach Infektion bei 45°. (Reisolierung 30 min nach Infektion).

Besonderheit wurde auch hier ein ringförmiges Molekül (von normaler Länge) gefunden.

3.6.4 Renaturierungskinetik bei ts-Mutanten

Temperatursensitivität von Proteinfunktionen kann auf die Sensitivität des Proteins selbst gegen erhöhte Temperatur oder auf Sensitivität der Synthese des Proteins zurückzuführen sein. Ist ersteres der Fall, so besteht die Möglichkeit, daß das bei hoher Temperatur beeinträchtigte Protein bei Temperaturerniedrigung wieder funktionsfähig wird. Erniedrigt man die Temperatur und inhibiert gleichzeitig die Neusynthese von Protein mit Chloramphenicol, so kann man diesen Ansatz mit einem bei hoher Temperatur (+ Chloramphenicol) belassenen vergleichen. Findet

man bei niedriger Temperatur gegenüber nicht-permissiver Temperatur einen Anstieg in der Aktivität der zu testenden Funktion, der den von uninfizierten Zellen signifikant überschreitet, so kann man durch die offensichtliche Renaturierung des Proteins schließen, daß die Temperatursensitivität der Mutante auf ein sensitives Proteinprodukt zurückzuführen ist. Tests mit den dna$^-$-ts-Mutanten zeigten, daß nur das tsA74- und das tsA80-Produkt renaturierfähig ist (Abb. 28).

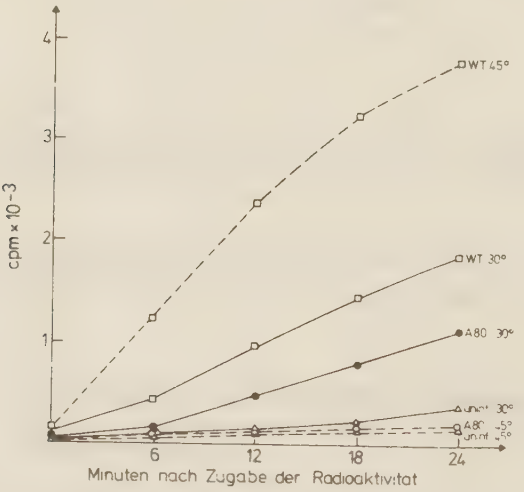


Abbildung 28: Renaturierungskinetik. Die Vorbehandlung der dnaB ts134-Zellen ist identisch mit der in 2.15 beschriebenen, außer daß NaI weggelassen wurde, da es bei 30° Phagenreplikation stört. Nach Beendigung der Adsorption durch Antiserum wurde 12 min Proteinsynthese bei 45° erlaubt, 3 Vol. TY + 5 µg Thymin/ml + 200 µg AdR/ml und final 150 µg Chloramphenicol/ml + 6,6 µCi ^{3}H-TdR/ml zugegeben. Eine Hälfte des Ansatzes wurde bei 45° belassen, die andere auf 30° gesetzt und Proben zur Messung des ^{3}H-TdR-Einbaus entnommen.

3.6.5 Suche nach amber-Mutanten von SPP1, die in der DNA-Synthese geschädigt sind

18 amber-Mutanten aus 14 Cistren wurden wie die ts-Mutanten dem DNA-Synthese-Test unterworfen, 4 davon - in 3 Cistren befindlich - zeigen Einbau wie uninfizierte Zellen.

Der ursprüngliche Wirtsstamm dnaB ts134 supprimiert Nonsense-Mutationen nicht. In einem isogenen Suppressorstamm, KB3, wachsen amber-Mutanten. In diesem Stamm erhöht sich der Einbau der dna^--Mutanten teilweise auf Werte, die denen von dna^+-Mutanten gleichkommen, speziell bei am109 (Abb. 29 a,b). ^{3}H-TdR-Einbau von am109 im su^+-Stamm ist auch von Esche (1974) beobachtet worden, was ein weiteres Mal die Markierungstechnik stützt. (dna^- - amber-Mutanten sind in Abb. 31 dargestellt.)

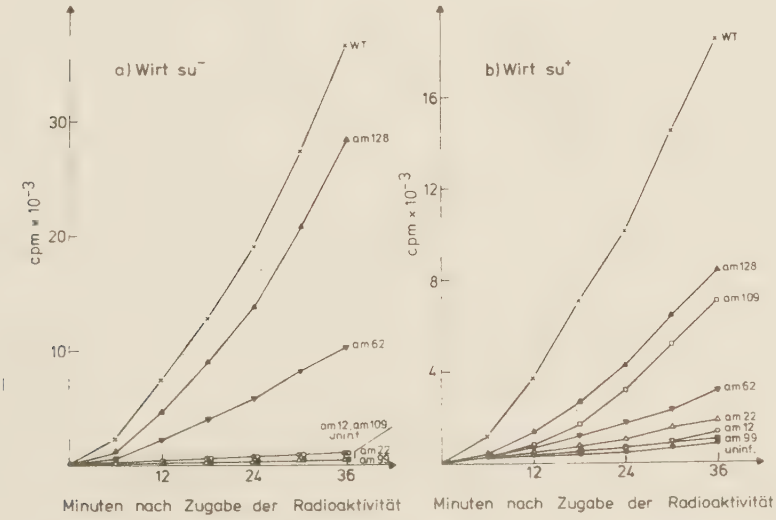


Abbildung 29 a,b: Einbaukinetiken von amber-Mutanten nach Infektion von su^-(dnaB ts134) und su^+(KB3)-Zellen.

Amber-Mutanten wie am62 und am128, die im su^--Stamm guten Einbau zeigen, replizieren gleich effektiv im su^+-Stamm.

3.6.6 Komplementationskinetik

Amber-Mutanten, die in der DNA-Synthese geschädigt sind, replizieren im su^+-Wirt. Das analoge Experiment, entsprechende ts-Mutanten bei tiefer Temperatur zu testen, läßt sich nicht ausführen, da Phagenreplikation bei 30° inhibiert wird (Abb. 8). Anstelle dessen kann man prüfen, ob diese Mutante generell fähig ist, bei hoher Temperatur zu replizieren, wenn man das

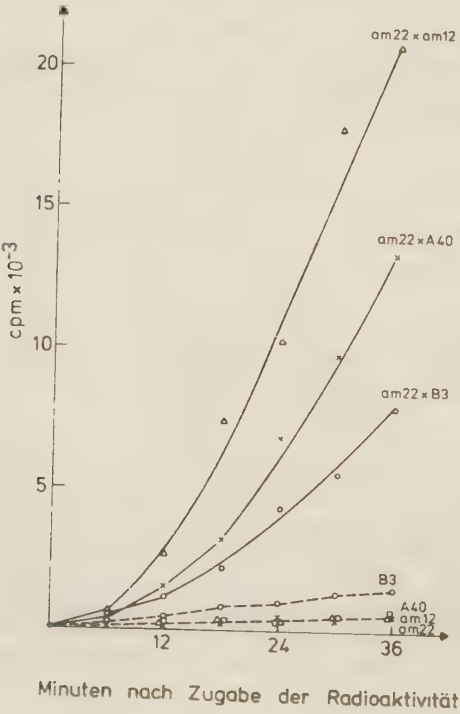


Abbildung 30: Komplementationskinetik. Durchgezogene Linien repräsentieren Einbaukinetiken von Doppelinfektionen nach Vorbehandlung der Zellen wie in 2.15 beschrieben, unterbrochene Linien stellen den Einbau nach Einfachinfektion mit dna^--Mutanten unter denselben Bedingungen dar.

betreffende Wildtyp-Allel durch Infektion mit einer anderen dna$^-$-ts- oder -amber-Mutante liefert, die in einem anderen Cistron defekt ist. Abb. 30 zeigt die Einbaukinetiken von Doppelinfektionen mit dna$^-$-Mutanten unter nicht-permissiven Bedingungen für beide Partner. dnaB ts134 wurde hier z.B. mit am22 als einem Partner und verschiedenen ts- und amber-Mutanten aus anderen Cistren als zweitem Partner infiziert. Durch Komplementation wird Replikation ermöglicht, während sie in Einzelinfektionen blockiert ist. Dieselbe Art von Komplementation findet man auch in Mischinfektionen von ts-Mutanten allein. Kein Widerspruch ließ sich zwischen Komplementationstest auf Platten und diesen Komplementationskinetiken finden.

4. Diskussion

Die Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit über Biochemie und Genetik der SPP1 Replikation lagen im wesentlichen in folgenden Punkten:

1. Welche Rolle spielt die Zellmembran bei Transfektion und Infektion von SPP1? Ist sie Syntheseort für SPP1 DNA?
2. Entwicklung eines spezifischen Markierungssystems zur Analyse der DNA-Synthese und replikativer Intermediate von SPP1.
3. Aufbau einer quantitativen Reisolierungsmethode für replizierende SPP1 DNA.
4. Erfassung der für SPP1 Replikation notwendigen Phagenfunktionen.

4.1 Welche Rolle spielt die Zellmembran bei Transfektion und Infektion von SPP1?

Die Zellmembran übernimmt wichtige und vielfältige Funktionen in der Bakterienzelle. Eine davon besteht darin, als eine Art primitiver mitotischer Apparat die präzise Verteilung replizierter Chromosomen auf die Tochterzellen zu gewährleisten. Pulse von ^{3}H-TdR markieren in *B. subtilis* (Ganesan und Lederberg, 1965; eigene Daten) und E. coli (Fuchs und Hanawalt, 1970) selektiv die Membranfraktion. Desgleichen wurde bis jetzt bei allen daraufhin untersuchten Bakteriophagensystemen eine Membranassoziation parentaler DNA und in den meisten Fällen auch eine Bindung replizierender Phagen-DNA an die Membran fest-

gestellt (Siegel und Schaechter, 1973; Kohler, 1976). Das von Gilbert und Dressler (1968) vorgeschlagene "rolling circle"-Modell der DNA-Replikation fordert sogar die Fixierung des verdrängten 5'-Endes eines der Matrizenstränge an einer Struktur, für die nur die Wirtszellmembran in Frage kommen kann.

Nester und Dooley (1973) fanden, daß bei Transformation in B. subtilis sowohl Rezipienten- als auch Donor-DNA in der Membranfraktion angereichert sind. Wenn es Gemeinsamkeiten in der DNA-Aufnahme bei Transformation und Transfektion gibt, sollte transfizierende DNA nach Penetration der Zellhülle ebenfalls an die Membran binden. Derart gebundene DNA könnte in Renografingradienten als schnell sedimentierendes Material identifiziert werden, das die charakteristischen Sensitivitäten von DNA-Membrankomplexen besitzen sollte.

Ein solcher Komplex wurde tatsächlich nach Transfektion mit ^{3}H-SPP1 DNA wie auch mit ^{3}H-T3 DNA erhalten. DNA-Aufnahme und Bindung an die Membran ist von der Kompetenz der Zellen abhängig; in nicht-kompetenten Zellen findet keine Bindung statt. Denkbare Artefaktmöglichkeiten konnten durch Kontrollversuche ausgeschlossen werden. Obwohl die letzten Schritte bei Transformation und Transfektion sehr verschieden sind (Integration der Donor-DNA in das Rezipientenchromosom bzw. Rekombination zur Bildung replikationsfähiger Phagen-DNA) ist das Membranbindungsverhalten von DNA in beiden Vorgängen gleichartig.

Auch nach Infektion mit ^{3}H-SPP1 Phagen konnte eine DNA-Membranassoziation gefunden werden. Komplexierte, schnell sedimentierende DNA ist sowohl nach Infektion wie auch nach Transfektion sensitiv gegenüber DNaseI, Pronase P, Sarkosyl und - wie in

Zusammenarbeit mit Ph. Kohler festgestellt wurde - auch gegen Phospholipase C , was die Beteiligung von Membrankomponenten deutlich macht. In beiden Fällen konnte keine Sensitivität gegenüber RNaseA-Behandlung festgestellt werden. Daraus kann geschlossen werden, daß SPP1 nicht über verdaubare RNA an die Membran bindet, wie dies bei SP82G der Fall ist (Kohler, 1976).

Die genaue Art der Bindung ist bis jetzt noch in keinem System aufgeklärt. Sie kann bei B. subtilis Transfektion nicht eine Art Erkennungssystem für kompatible DNA sein, sonst würde T3 DNA nicht gebunden. Die Ausbildung des Komplexes bei SPP1 Transfektion und Infektion erfolgt in Abwesenheit von RNA-, Protein- oder DNA-Synthese. Sie muß abhängig sein von Zellkomponenten, die einen geringen turnover besitzen. Die Unabhängigkeit von DNA-Replikation zeigt sich auch darin, daß der Komplex sofort nach Infektion entsteht. Die Bindung infizierender DNA ist nicht vollständig, aber bis zu 75 % der infizierenden SPP1 DNA befinden sich früh nach Infektion in der schnell sedimentierenden Fraktion (Kohler, 1976).

Multimere DNA findet man nach Transfektion nicht in freier Form, sondern nur als Membrankomplex wieder, d.h. die Membran ist Entstehungsort für konkatemere SPP1 DNA nach Transfektion.

Markiert man selektiv replizierende SPP1 DNA mit einem kurzen Puls an ^{3}H-TdR, so findet man die Radioaktivität ausschließlich in der Membranfraktion wieder. Infizierende SPP1 DNA repliziert demnach ebenfalls an der Zellmembran. Weitere Hinweise dafür sind:

1. Puls-Chase Versuche (an der Membran pulsmarkierte DNA wird

nach Chase freigesetzt).

2. Nach einem Puls von der Membran reisolierte Moleküle haben hauptsächlich die Größe von Multimeren, während reisolierte DNA nach Chase SPP1 Größe besitzt.

3. Freie, in Renografingradienten langsam sedimentierende DNA besitzt dagegen immer die Größe von SPP1 DNA.

Die erhaltenen Daten deuten daraufhin, daß DNA eine generelle Affinität zur Zellmembran haben muß, Bindung über Enzyme wie DNA-Polymerasen ist nicht sehr wahrscheinlich, im Gegenteil, neu-synthetisierte DNA-Moleküle werden allmählich von der Membran entlassen. Dies läßt vermuten, daß die Affinität dieser Moleküle zur Membran im Stadium des Prozessierens der DNA erniedrigt ist, was durch Komplexierung mit entsprechenden Proteinen, z.B. auch Verpackungsproteinen erreichbar wäre.

Eine Aufgabe der Membran könnte demnach darin bestehen, daß sie durch Bindung der DNA sofortiges Verpacken parentaler Moleküle nach kurzer Transkription und Translation verhindert und die DNA für Replikationsenzyme zugänglich macht. Zur Prüfung dieser Hypothese könnte man untersuchen, ob Phagenmutanten, die in der Verpackung viraler DNA defekt sind, replizierte DNA noch von der Membran freisetzen können.

Ein weiterer, wichtiger Effekt von Membranbindung wäre Schutz der DNA vor zellulären DNasen in der Zeit, wo noch keine DNase-Inhibitoren synthetisiert werden können. Ph. Kohler (1976) fand Hinweise dafür, daß membrangebundene DNA besser vor Nukleasen geschützt ist als freie DNA.

4.2 Markierungssystem für replizierende SPP1 DNA - Sedimentationsanalyse replikativer Intermediate

Zur Messung von SPP1 DNA-Replikation kann man nicht ohne weiteres den Einbau von ^{3}H-TdR in infizierte Zellen verfolgen, da der Phage offensichtlich keinen Mechanismus besitzt, die Replikation der Wirts-DNA zu hemmen. Wird ^{3}H-TdR bei 45° zu dnaB ts134 Zellen gegeben, die mit SPP1 infiziert worden sind, findet man über 90 % der eingesetzten Radioaktivität in SPP1 DNA, der Einbau ist also phagenspezifisch. Dies konnte durch vier Kriterien belegt werden:

1. Der Einbau ist durch HPUra hemmbar.

2. In einem restringierenden Wirt erfolgt nur nach Infektion mit modifizierten Phagen Synthese, nicht aber bei Infektion mit unmodifizierten SPP1.

3. In Sucrosegradienten stimmt das Sedimentationsverhalten markierter DNA (mit Ausnahme konkatemerer Formen) mit dem von nativer SPP1 DNA überein.

4. Reisolierte, gereinigte, ^{3}H-markierte DNA zeigt nach Verdauung mit der Restriktionsendonuklease Eco RI und Agarose-Gelelektrophorese dasselbe Bandenmuster wie verdaute, native SPP1 DNA und besitzt (außer bei Konkatemeren) dieselbe Sedimentationsgeschwindigkeit.

Frühe Pulse in SPP1 infizierte Zellen weisen schnell sedimentierende DNA der Größe von Di- und Trimeren nach (schnell sedimentierende DNA wurde auch von S. Riva beobachtet, pers. Mitteilung). Das Auftreten dieser DNA in Sucrosegradienten ist an

permissive SPP1 DNA gebunden. Sie wird nach Chase in DNA von SPP1 Länge überführt. Die Synthese des großen Materials erfolgt früh nach Infektion (ab etwa 6 min). Bei Infektion mit ^{14}C-SPP1 befindet sich sehr wenig parentale DNA an der Position der ^{3}H-markierten, schnell sedimentierenden DNA. Nur wenige Moleküle scheinen sich an der Bildung von Konkatemeren zu beteiligen. Auch beim Phagen λ nimmt nur ein Teil der DNA-Moleküle am Replikationsgeschehen teil (Arber und Dussoix, 1962). Möglicherweise gibt es für SPP1 einen Carrierzustand, der erklären könnte, warum SPP1 Infektion oft abortiv verläuft und wie SPP1 generell transduzierend wirkt (Yasbin und Young, 1974).

Späte Pulse an ^{3}H-TdR gehen in monomere DNA. Frühe SPP1 Replikation erfolgt demnach über konkatemere Formen, späte Replikation wahrscheinlich über Monomere.

Genetische Daten und Restriktionsanalysen fordern konkatemere Zwischenstufen in der SPP1 DNA-Replikation: die SPP1 Genkarte weist eine partielle zirkuläre Permutation auf, die nur durch bestimmte Schneidemechanismen beim Prozessieren multimerer DNA erklärbar ist (Trautner et al., zur Veröffentlichung). Die hier gezeigten Sedimentationsanalysen replizierender SPP1 DNA bestätigen diese Postulate.

4.3 Quantitative Reisolierung replizierender SPP1 DNA

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung replizierender Moleküle konnte die Phagen-DNA durch Dichtegradientenzentrifugation von Wirts-DNA, die mit 5-BU vormarkiert worden war, abgetrennt werden.

Die elektronenmikroskopische Analyse derartig gereinigter SPP1 DNA bestätigt das Bild aus den Sucrosegradienten: bei einem frühen Puls findet man etwa 20-30 % an Konkatemeren und deren Bruchstücken; ein später Puls zeigt im wesentlichen monomere DNA. Da bei der Präparation hochmolekularer und replizierender DNA die Spreitung für die Elektronenmikroskopie schlechter ist als bei nicht-replizierender, monomerer DNA (replizierende DNA bleibt bevorzugt verknäuelt und ist nicht ausmeßbar), und der Anteil replizierender Moleküle an der Gesamtpopulation pro Zeiteinheit nicht sehr groß zu sein scheint, war die Ausbeute an diesen DNA-Formen entsprechend gering. Nur ein intaktes, replizierendes Molekül von SPP1 Größe wurde gefunden. Dieses war zu einem Drittel repliziert, zeigte aber kein DNA-"Auge", sondern eine Gabelung. Außerdem wurden ringförmige, monomere Moleküle beobachtet.

Die bisherigen Befunde lassen sich zu einem Modell für das Verhalten von SPP1 DNA nach Transfektion und Infektion zusammenfassen:
parentale DNA bindet, nachdem sie in die Zelle gelangt ist, an die Cytoplasmamembran und beginnt bei Infektion nach einer lag-Phase von mehr als 6 min zu replizieren; bei Transfektion müssen Rekombinationsschritte der Replikation vorgeschaltet sein. Bei der Replikation (möglicherweise über einen dem Phagen T7 ähnlichen Mechanismus, Watson, 1972) entstehen in Membranbindung lineare Konkatemere von SPP1 DNA, die zu DNA von Einheitslänge geschnitten werden und sich dabei von der Membran ablösen. Spät in der Replikation findet bevorzugt DNA-Synthese in monomerer DNA statt. Die gefundenen ringförmigen Moleküle könnten in diesem Schema Vorstufen der rolling circle Replikation

sein; da bei ihnen aber keinerlei lineare Abzweigungen festzustellen sind, könnten sie ebensogut Anfangsstadien von "theta"-Replikation wie bei früher Replikation des Phagen λ sein (Ogawa et al., 1968). Da aus bereits genannten Gründen der Anteil im Elektronenmikroskop beobachtbarer, replizierender Moleküle sehr gering ist, müssen noch eine große Anzahl von DNA-Proben untersucht werden, um die ringförmigen Moleküle in ihrer Bedeutung zu erfassen und in das geschilderte Modell einzuordnen, sofern nicht eine modifizierte Spreitungstechnik mehr replizierende Moleküle ausmeßbar machen kann.

4.4 SPP1 Cistren für Phagenreplikation

SPP1 benötigt zur eigenen Reproduktion einen großen Teil von Wirtsfunktionen. Er verwendet sowohl die RNA- als auch die DNA-Polymerase III des Wirts. Andererseits ist er unabhängig von den B. subtilis-Funktionen dnaB, dnaC, dnaG und dnaH. Um wenigstens teilweise vom Replikationsapparat des Wirts unabhängig zu sein und dabei zumindest indirekt und allmählich die Wirtsreplikation zu stoppen, muß der Phage spezifische Funktionen, die von seiner DNA kodiert werden oder besondere "sites" auf seiner DNA benutzen. Start und Aufrechterhaltung der SPP1 Replikation ist Chloramphenicol-sensitiv, was deutlich macht, daß der Phage für eigene Proteine kodiert, die Wirtsenzyme modifizieren oder ergänzen können. Außerdem zeigen die Renaturierungskinetiken der Mutanten tsA74 und tsA80, daß es zumindest ein temperatursensitives Genprodukt des Phagen gibt, das an der SPP1 DNA-Replikation beteiligt ist. Die Unabhängigkeit von dnaB und anderen Wirtsfunktionen kann deshalb nicht allein einer verschiedenen Struktur von SPP1 DNA gegenüber Wirts-DNA

zuzuschreiben sein, bei der z.B. die Initiationsfunktion dnaB entbehrlich wäre. Vom Zeitverlauf der Chloramphenicolwirkung kann man schließen, daß das Antibiotikum die Synthese früher Phagenprodukte verhindert, die zur SPP1 Replikation benötigt werden. Sobald diese allerdings synthetisiert sind, können sie Phagenreplikation für eine gewisse Zeit gewährleisten. Späte Zugabe von Chloramphenicol hat nur noch geringen Einfluß auf SPP1-spezifischen ^{3}H-TdR Einbau.

Die Untersuchungen an SPP1 Mutanten konzentrierten sich auf die Identifizierung von Mutanten, die in der DNA-Synthese geschädigt sind, d.h., deren Einbau von ^{3}H-TdR den von uninfizierten Zellen gleicht. Die Mutante tsI17 zeigte eine von allen anderen Mutanten abweichende Einbaukinetik, die darauf schließen ließ, daß in Zellen, infiziert mit tsI17 bei 45°, Phagenreplikation gestartet, aber nicht unterhalten wird. Der Grund dafür kann in einer Schädigung eines Elongationsfaktors in der DNA-Replikation liegen oder aber in einer Konkurrenz von Synthese und Abbau, die bei Wildtypinfektion regulatorisch verhindert wird. Die Ergebnisse der analytischen Sucrosegradienten und der Reisolierung von tsI17 DNA nach Infektion bei 45° deuten darauf hin, daß die DNA dieser Mutante bei 45° abgebaut wird.

Die Mehrzahl der getesteten Mutanten zeigt denselben Einbau wie mit Wildtyp infizierte Zellen, wobei die Testbedingungen nicht ausschließen können, daß darunter auch DNA-Überproduzenten zu finden wären.

Die Blockierung von dna^{-} amber-Mutanten in der DNA-Synthese wird bei Infektion des supprimierenden Stammes großenteils aufgehoben, wie aus den Steigungen der Einbaukurven ersicht-

lich ist. Der Grad der Suppression variiert in gewissen Grenzen und geht wahrscheinlich parallel der Wurfgröße dieser Mutanten.

Wie aus in vivo Komplementation und den Komplementationskinetiken ersichtlich ist, besitzen die untersuchten Mutanten keine cis-wirkende Funktionen, die DNA-Synthese auch bei Mischinfektionen verhindern. Die 10 ts- und die 4 amber-Mutanten, die in der DNA-Synthese betroffen sind, lassen sich durch Komplementation in 8 Cistren gruppieren. In Helfertransfektion (Rottländer und Trautner, 1970) können alle dna-Marker durch Transfektion mit den Eco RI-Restriktionsfragmenten 1 und 4 von Wildtyp-DNA "gerettet" werden. Dies verweist sie auf einen zusammenhängenden Bereich am linken Ende der SPP1 Genkarte. Dieser Befund wird durch Phagenkreuzungen unter den dna$^-$-Mutanten selbst und zwischen ihnen und Außenmarkern unterstützt. (Kartierungsdaten von Lüder und Trautner, zur Veröffentlichung). Abb. 31 zeigt

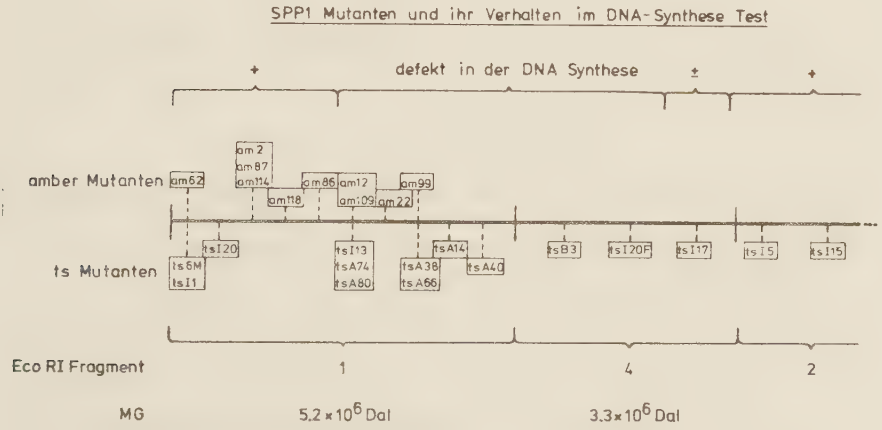


Abbildung 31

die Anordnung von amber- und ts-Mutanten auf dem linken Ende der SPP1 Genkarte. Kästen um Mutantenbezeichnungen verdeutlichen individuelle Cistren - definiert durch Komplementationsanalyse, die durch Daten von 2-Faktorkreuzungen angeordnet wurden. Wie auch bei T4 (Stahl et al., 1970), T7 (Studier, 1972) und anderen Phagen scheinen auch auf der SPP1 Genkarte verwandte Funktionen in Gruppen angeordnet vorzuliegen.

Für einen Phagen dieser Größe scheinen 8 Gene für die DNA-Synthese viel zu sein, wenn man bedenkt, daß der lysogene Phage λ nur mit den Genprodukten O und P zur viralen Replikationsmaschinerie beiträgt (Klein und Powling, 1972). Im verwandteren T7 System sind jedoch 6 Gene gefunden worden, deren Funktionen ermittelt sind und die essentiell für die T7 DNA-Replikation sind (Studier, 1972). T7 ist wesentlich weniger von Wirtsfunktionen abhängig als SPP1: er kodiert für eine eigene DNA- und RNA-Polymerase. Um die Matrizenspezifizität der Wirtspolymerasen, die von SPP1 benutzt werden, bevorzugt auf sites auf der Phagen-DNA zu lenken, bedarf es offensichtlich eines Aufwands an Phagenfunktionen, der ähnlich dem jener Phagen ist, die für ihre eigenen Polymerasen kodieren.

Bis jetzt ist noch nicht viel über die Regulation der Genexpression in SPP1 bekannt. Das Gen, das den Mutanten am12, am109, tsI13, tsA74 und tsA80 entspricht, wirkt pleiotrop auf die Expression später Gene und die DNA-Replikation des Phagen (Esche, 1974). Aus den Ergebnissen dieser Arbeit könnte man dem tsI17 Gen eine Schutzfunktion für replizierende DNA zuschreiben. Mit Ausnahme dieser beiden Gene sind 6 Funktionen in der SPP1 DNA-Replikation gänzlich unbekannt. Darüber hinaus würden Mutanten,

die im Prozessieren konkatemerer DNA defekt sind, nicht von dem hier vorgestellten DNA-Synthese-Test erfaßt werden. Die Zahl der DNA-Gene könnte somit noch ansteigen!

Die genaue biochemische Analyse der dna^--Mutanten von SPP1 wird sicherlich längere Zeit in Anspruch nehmen. Aus diesen Ergebnissen sollte hervorgehen, wie ein in weitem Maße wirtsabhängiger Phage es schafft, sich in der befallenen Zelle durchzusetzen und sich zu reproduzieren, ohne die zellulären Synthesen aktiv zu inhibieren.

5. Zusammenfassung

1. SPP1 DNA bindet an die Wirtszellmembran, sowohl nach Infektion als auch nach Transfektion. Diese Komplexbildung ist nicht hemmbar durch Inhibitoren der Replikation, der Transkription oder der Translation. Die Membranbindung ist bei Transfektion von der Kompetenz der Zellen abhängig. Auch heterologe T3 DNA wird gebunden.

2. Die Membran ist Syntheseort für SPP1 DNA nach Infektion und Transfektion. Von der Membran können replizierende, konkatemere DNA-Moleküle reisoliert werden. An der Membran synthetisierte Moleküle werden über die Zeit ins Cytoplasma entlassen.

3. Ein Markierungssystem für replizierende SPP1 DNA wurde aufgebaut, bei dem mehr als 90 % der angebotenen Radioaktivität spezifisch in SPP 1 DNA geht. Unter diesen Markierungsbedingungen ist Phagenvermehrung möglich.

4. In analytischen Sucrosegradienten ist früh nach Infektion neu-synthetisierte, konkatemere DNA von etwa 2-3facher Länge der SPP1 DNA nachweisbar, an deren Entstehung nur wenige parentale Moleküle beteiligt sind. Diese konkatemere DNA wird im Verlauf des Infektionszyklus zu DNA von Einheitslänge prozessiert. Bei alkalischem pH zerfällt sie in Einzelstränge von SPP1 Länge und größer.

5. Durch Dichtemarkierung der Wirts-DNA mit D_2O bzw. 5-BU konnte replizierende SPP1 DNA quantitativ reisoliert und ausgemessen werden. Die Größenanalyse dieser Moleküle deckt sich mit den Befunden aus den Sedimentationsuntersuchungen neu-synthetisierter DNA zu verschiedenen Zeiten nach Infektion. Als Besonderheit wurden ringförmige Moleküle von SPP1 Länge gefunden, die aber nicht mit "rolling circle"-Replikation in Verbindung gebracht werden können. Ein lineares, zu 1/3 repliziertes Molekül weist auf eine exzentrische Lage des SPP1 Origins für DNA-Replikation hin.

6. SPP1 DNA-Synthese ist von Proteinsynthese abhängig. Temperatursensitive Mutanten aus 7 Cistren zeigen Defekte in der DNA-Synthese, amber-Mutanten aus 3 Cistren replizieren nicht in nicht-supprimierenden Wirtszellen. Replikation ist möglich in supprimierenden Zellen oder nach Komplementation durch eine andere dna^--Mutante. Alle dna^--Mutanten liegen in einem Cluster auf der SPP1 Genkarte.

6. Literatur

Arber, W. and Dussoix, D.: Host specificity of DNA produced by Escherichia coli. I. Host controlled modification of bacteriophage λ.
J. Mol. Biol. (1962), 5, 18-36

Barlatti, S.: Incorporation of uridine into Bacillus subtilis and SPP1 bacteriophage DNA.
J. Bact. (1970), 101, 330

Behncke, M.: Genkonversion bei dem B. subtilis Phagen SPP1. Untersuchungen von Heteroduplices aus komplementären DNA-Strängen mit Wildtyp- und Konditional-letalem Mutantengenotyp.
Dissertation, Fachbereich Biologie, Freie Universität Berlin (1973)

Boyce, R.P. and Setlow, R.B.: A simple method of increasing the incorporation of thymidine into the deoxyribonucleic acid of Escherichia coli.
Biochem. Biophys. Acta (1962), 61, 618-620

Burgi, E. and Hershey, A.D.: Sedimentation rate as a measure of molecular weight of DNA.
Biophys. J. (1963), 3, 309-321

Burnett, L. and Wake, R.G.: Initiation and termination of chromosome replication at 45°C in a dna-ts-mutant of B. subtilis 168, tsB134.
J. Bact. (1977), 130,1, 538-539

Canosi, U., Siccardi, A.G., Falaschi, A. and Mazza, G.: Effect of deoxyribonucleic acid replication inhibitors on bacterial recombination.
J. Bact. (1976), 126,1, 108-121

Echols, H.: Developmental pathways for the temperate phage λ : Lysis vs Lysogeny.
Ann. Rev. Genet. (1972), 6, 157-190

Esche, H.: Virusspezifische Proteinsynthese nach Infektion von B. subtilis mit SPP1.
Dissertation, Fachbereich Biologie, Freie Universität Berlin (1974)

Földes, J. and Trautner, T.A.: Infectious DNA from a newly isolated B. subtilis phage.
Z. Vererbungslehre (1964), 95, 57-65

Fuchs, E. and Hanawalt, P.: Isolation and characterization of the DNA replication complex from Escherichia coli.
J. Mol. Biol. (1970), 52, 301-322

Ganesan, A.T. and Lederberg, J.: A cell-membrane bound fraction of bacterial DNA.
Biochem. Biophys. Commun. (1965), 18, 824-835

Ganesan, A.T., Andersen, J.J., Luh, J. and Effron, M.: DNA metabolism in Bacillus subtilis and its phage SPP1.
Microbiology 1976 ed. by D. Schlessinger (AMS), 319-326

Gilbert, W. and Dressler, D.: DNA replication: the rolling circle model.
Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. (1968), 33, 473-484

Ivarie, R.D. and Pêne, J.J.: Association of the Bacillus subtilis chromosome with the cell membrane: resolution of free and bound deoxyribonucleic acid on renografin gradient.
J. Bact. (1970), 104,2, 839-850

Ivarie, R.D. and Pêne, J.J.: DNA replication in bacteriophage Ø29: the requirement of a viral-specific product for association with the cell membrane of Bacillus amyloliquefaciens.
Virol. (1973), 52, 351-362

Kahmann, R.: Das Verhalten von SPP1 DNA nach Transfektion von B. subtilis.
Dissertation, Fachbereich Biologie, Freie Universität Berlin (1974)

Klein, A. and Powling, A.: Initiation of λ DNA replication in vitro.
Nature New Biol. (1972), 239, 71

Kleinschmidt, A.K. and Zahn, R.K.: Über Desoxyribonukleinsäure-Molekeln in Protein-Mischfilmen.
Z. f. Naturforsch. (1959), B 14, 770-779

Klotz, G.: Direction of SPP1 replication in transfected B. subtilis cells.
Molec. gen. Genet. (1973), 120, 95-100

Kohler, Ph.S.: Biochemical and genetic analysis of the formation of membrane-complexed DNA following infection of Bacillus subtilis by bacteriophage.
Dissertation, Univ. of New Hampshire (1976)

Kolenbrander, P.E., Hemphill, H.E. and Whiteley, H.R.: Nucleic acid synthesis in bacteriophage SPO2 c1-infected Bacillus subtilis.
J. Virol. (1972), 9, 776-784

Lavi, K. and Marans, M.: Arrest of host DNA synthesis in Bacillus subtilis infected with phage Øe.
Virol. (1972), 49, 668-674

Mackenzie, J.M., Neville, M., Wright, G.E. and Brown, N.C.: Hydroxyphenylazopyrimidines: Characterization of the active forms and their inhibitory action on a DNA polymerase from B. subtilis.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) (1973), 70, 512-516

Mendelson, N.H. and Gross, J.D.: Characterization of a temperature-sensitive mutant of Bacillus subtilis defective in deoxyribonucleic acid replication.
J. Bact. (1967), 94,5, 1603-1608

Milanesi, G. and Cassani, G.: Transcription after bacteriophage SPP1 infection in Bacillus subtilis.
J. Virol. (1972), 10, 187-192

Montenegro, M., Esche, H. and Trautner, T.A.: Induction of mutations in B. subtilis phage SPP1 by growth on host cells carrying a mutator DNA polymerase III.
Molec. gen. Genet. (1976), 149

Nester, E.W. and Dooley, D.C.: DNA-membrane interactions in the B. subtilis transformation system.
in: Bacterial Transformation, Proceedings of the First European Meeting held at the Gulbenkian Institute of Science, Oeiras, Portugal (1972), 183-202

Ogawa, T., Tomizawa, J. and Fuke, M.: Replication of bacteriophage DNA: II. structure of replicating DNA of phage Lambda.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) (1968), 60, 861-865

Okubo, S. and Yanagida, T.: Isolation of a suppressor mutant in B. subtilis.
J. Bact. (1968), 95, 1187-1188

Riva, S., Polsinelli, M. and Falaschi, A.: A new phage of Bacillus subtilis with infectious DNA having separable strands.
J. Mol. Biol. (1968), 35, 347-356

Rottländer, E. and Trautner, T.A.: Genetic and transfection studies with B. subtilis phage SP50. I. Phage mutants with restricted growth on B. subtilis strain 168.
Molec. gen. Genet. (1970), 108, 47-60

Ryter, A.: Association of the nucleus and the membrane of bacteria: a morphological study.
Bact. Rev. (1968), 32, 39-54

Sadowski, P.D. and Kerr, C.: Degradation of Escherichia coli B deoxyribonucleic acid after infection with deoxyribonucleic acid defective amber mutants of bacteriophage T7.
J. Virol. (1970), 6,2, 149-155

Schachtele, C.F., Reilly, B.E., De Sain, C.V., Whittington, M.O. Anderson, D.L.: Selective replication of bacteriophage Ø29 deoxyribonucleic acid in 6-(p-hydroxyphenylazo)-uracil treated B. subtilis.
J. Viorl. (1973), 11, 153-155

Schläger, E.J.: Das Ausmaß der DNA-Reparatursynthese während der Primär-Rekombination bei Transfektion mit Bacillus subtilis.
Dissertation, Universität Freiburg (1973)

Siegel, P.J. and Schaechter, M.: The role of the host cell membrane in the replication and morphogenesis of bacteriophages.
Ann. Rev. Microb. (1973), 27, 261-282

Spatz, A.Ch. and Trautner, T.A.: One way to do experiments on gene conversion?
Molec. gen. Genet. (1970), 109, 84-106

Spatz, H.Ch. and Trautner, T.A.: The role of recombination in transfection of B. subtilis.
Molec. gen. Genet. (1971), 113, 174-190

Spizizen, J.: Transformation of biochemically deficient strains of Bacillus subtilis by deoxyribonucleate.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) (1958), 44, 1072-1078

Stahl, F.W., Crasemann, J.M., Yegian, Ch., Stahl, M.M. and Nakata, A.: Cotranscribed cistrons in bacteriophage T4. Genetics (1970), 64, 157-170.

Studier, F.W.: Bacteriophage T7. Science (1972), 176, 367-376

Trautner, T.A., Pawlek, B., Bron, S. and Anagnostopoulos, C.: Restriction and modification in B. subtilis. Biological aspects. Molec. gen. Genet. (1974), 109, 181-191

Watson, J.D.: Origin of concatemeric T7 DNA. Nature New Biol. (1972), 239, 197-201

Yasbin, R.E. and Young, F.E.: Transduction in Bacillus subtilis by bacteriophage SPP1. J. Virol. (1974), 14, 1343-1348

Zahler, S., Korman, R.Z., Rosenthal, R. and Hemphill, H.E.: Bacillus subtilis bacteriophage SPß: localization of the prophage attachment site, and specialized transduction. J. Bact. (1977), 129,1, 556-558

Lebenslauf

22. April 1950	wurde ich als Sohn des Straßenbahnschaffners Hans Burger und dessen Ehefrau Pauline, geb. Hirsch, in Stuttgart geboren.
1957-1961	Besuch der Grundschule in Stuttgart
1961-1969	Besuch des humanistischen Eberhard-Ludwigs-Gymnasiums in Stuttgart
Juni 1969	Abitur an diesem Gymnasium
Oktober 1969	Immatrikulation an der Universität Stuttgart-Hohenheim zum Studium der Biologie
Februar 1973	Vordiplom in Biologie
SS 1973	Besuch spezieller Praktika und Vorlesungen über Mikrobiologie und Genetik an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg/Breisgau
Juli 1974 bis Januar 1975	Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie der Universität Hohenheim unter Anleitung von Dr. R. Süßmuth über das Thema: "Prophageninduktion mit Methylaminosulfonsäureäthylester"
Februar 1975	Beginn der Dissertation am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. T.A. Trautner